

Aus der Medizinischen Kleintierklinik
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Katrin Hartmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. habil. Ralf Müller

Der Einfluss von Helminthen auf die canine atopische Dermatitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Martina Helmer
aus Augsburg

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Müller
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

**Für meine Eltern
und Markus**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
I. Einleitung.....	11
II. Literaturübersicht.....	13
2.1. Atopische Dermatitis	13
2.1.1. Einführung	13
2.1.2. Klinik der caninen atopischen Dermatitis.....	15
2.1.3. Diagnose der caninen atopischen Dermatitis.....	16
2.1.4. Therapie der caninen atopischen Dermatitis.....	17
2.1.4.1. Glukokortikoide.....	17
2.1.4.2. Zyklosporin.....	18
2.1.4.3. Antihistaminika	19
2.1.4.4. Essentielle Fettsäuren	20
2.1.4.5. Allergen-spezifische Immuntherapie.....	21
2.2. <i>Trichuris vulpis</i>	22
2.2.1. Vorkommen und Entwicklung.....	22
2.2.2. Pathogenese und Klinik der Trichuriose beim Hund.....	22
2.2.3. Diagnose	23
2.2.4. Zoonosepotential.....	23
2.3. <i>Uncinaria stenocephala</i>	23
2.3.1. Vorkommen und Entwicklung.....	23
2.3.2. Pathogenese und Klinik der Uncinariose beim Hund.....	24
2.3.3. Diagnose	24
2.3.4. Zoonosepotential.....	24
2.4. Immunmodulation durch Helminthen bei allergischen Krankheiten.....	25
2.4.1. Helminthen und Allergien	25
2.4.2. Immunmodulation und Antigene	27
2.4.2.1. Erfahrungen beim Menschen.....	30
2.4.2.2. Erfahrungen bei anderen Spezies	32
2.4.3. Helminthenantigene	34
2.4.4. Helminthen als Therapie bei Allergien und immunbedingten Krankheiten.....	36

2.5.	Immunpathologie der atopischen Dermatitis.....	37
2.5.1.	Pathogenese der atopischen Dermatitis	37
2.5.2.	Akute Läsionen.....	40
2.5.3.	Chronische Läsionen	42
2.5.4.	Veränderungen mit erfolgreicher Therapie	43
2.5.5.	Nachweis von Zytokinen.....	45
2.6.	Histopathologie der atopischen Dermatitis.....	45
2.6.1.	Beim Menschen	45
2.6.2.	Beim Hund.....	46
III.	Material und Methoden	49
3.1.	Material.....	49
3.1.1.	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	49
3.1.2.	Lösungen	51
3.1.3.	Geräte in alphabetischer Reihenfolge.....	53
3.1.4.	Sonstiges Material	55
3.1.5.	Antikörper für die Immunhistochemie	58
3.1.6.	Primer	58
3.1.7.	Helminthen	58
3.1.8.	Hunde	58
3.2.	Methoden.....	59
3.2.1.	Einschlusskriterien der Hunde.....	59
3.2.2.	Ausschlusskriterien der Hunde.....	60
3.2.3.	Randomisierung.....	61
3.2.4.	Behandlungsgruppen	61
3.2.5.	Studienprotokoll	61
3.2.6.	Entnahme der Hautstanzen	63
3.2.7.	RNA-Präparation.....	63
3.2.8.	Bioanalyzer.....	64
3.2.9.	Konzentrationsbestimmung von RNA	67
3.2.10.	cDNA-Synthese.....	67
3.2.10.1.	Elimination genomischer DNA.....	67
3.2.10.2.	Reverse Transkription (RT)	68
3.2.11.	Primer für die quantitative Polymerasekettenreaktion	68
3.2.11.1.	Primerdesign	69

3.2.11.2.	Etablierung der Primer für IL-10.....	70
3.2.11.2.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	70
3.2.11.2.2.	Agarosegelelektrophorese	71
3.2.11.2.3.	Ermittlung der Effizienz anhand von Standardkurven.....	72
3.2.11.2.4.	Prüfung der Primer mittels Sequenzierung	74
3.2.12.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	74
3.2.12.1.	Durchführung	74
3.2.12.2.	Auswertung der qPCR-Daten	75
3.2.13.	Positivkontrolle der Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA.....	77
3.2.14.	Kontrolle der RNA in der Agarosegelelektrophorese.....	77
3.2.15.	Detektion möglicher Inhibitoren im RNA-Extrakt.....	78
3.2.15.1.	Fällung der RNA mit Natriumacetat	78
3.2.15.2.	cDNA-Synthese und qPCR	78
3.2.16.	Histologie.....	79
3.2.16.1.	Fixation.....	79
3.2.16.2.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung	79
3.2.16.3.	Färbung der Paraffinschnitte	80
3.2.16.3.1.	Giemsa-Färbung.....	81
3.2.16.3.2.	Luna-Färbung.....	81
3.2.16.4.	Immunhistochemie	82
3.2.16.4.1.	Allgemeines zur Methodik.....	82
3.2.16.4.2.	Durchführung	83
3.2.16.5.	Auswertung.....	85
3.2.17.	Gewinnung und Lagerung der infektiösen Helminthenstadien	85
3.2.17.1.	<i>Trichuris vulpis</i>	85
3.2.17.2.	<i>Uncinaria stenocephala</i>	86
3.2.17.3.	Aufbewahrung in der Klinik.....	87
3.2.18.	Kotuntersuchungen im Flotationsverfahren.....	87
3.2.19.	Statistik	88
IV.	Ergebnisse.....	89
4.1.	Hunde.....	89
4.1.1.	Altersverteilung	89
4.1.2.	Geschlechtsverteilung.....	89

4.1.3.	Rassenverteilung.....	89
4.2.	Untersuchungsdaten	90
4.2.1.	CADESI.....	90
4.2.2.	Juckreiz.....	92
4.2.3.	Allgemeine Beurteilungen der Haut.....	94
4.3.	Etablierung der Primer für IL-10.....	95
4.3.1.	Polymerasekettenreaktion und Agarosegelelektrophorese.....	95
4.3.2.	Ermittlung der Effizienz	96
4.4.	Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	96
4.4.1.	Auswertung der qPCR-Daten	96
4.4.2.	Resultate der Zytokinexpression	98
4.4.2.1.	TGF- β	98
4.4.2.2.	IL-10.....	99
4.5.	Positivkontrolle der Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA	100
4.6.	Kontrolle der RNA in der Agarosegelelektrophorese	102
4.7.	Detektion möglicher Inhibitoren im RNA-Extrakt.....	103
4.8.	Histologische Auswertung.....	105
4.8.1.	Mastzellen.....	105
4.8.2.	Neutrophile Granulozyten	105
4.8.3.	Eosinophile Granulozyten	106
4.8.4.	Lymphozyten.....	107
4.8.4.1.	Luna-Färbung.....	107
4.8.4.2.	Immunhistochemische Färbung	107
4.9.	Kotuntersuchungen.....	108
V.	Diskussion	109
5.1.	Zusammenfassung der Studie.....	109
5.2.	Einfluss von Helminthen auf die Klinik allergischer Krankheiten.....	110
5.3.	Nebenwirkungen beim Hund.....	111
5.4.	Zoonosegefahr	111
5.5.	Einfluss von Helminthen auf die klinische Symptomatik von Hunden mit atopischer Dermatitis	112
5.6.	Einfluss von Helminthen auf die Zytokinexpression	113
5.7.	Beeinflussung des zellulären entzündlichen Infiltrats bei Atopie	116

5.8.	Ergebnisse der Kotuntersuchungen	119
VI.	Zusammenfassung	122
VII.	Summary	124
VIII.	Literaturverzeichnis	126
IX.	Anhang	148
9.1.	Abbildungsverzeichnis	148
9.2.	Tabellenverzeichnis	151
9.3.	Besitzer Einverständniserklärung	153
9.4.	Patientenprotokoll	154
	Danksagung	167

Abkürzungsverzeichnis

®	registrierte Marke
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
<i>A. lumbricoides</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
as	antisense
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
Con A	Concanavalin A
Ct-Wert	Cycle threshold-Wert
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der p1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> Antigen 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylendiamintetraacetic acid)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fc	kristallines Fragment (engl. Fragment crystalline)

FU	Fluoreszierende Einheit (engl. Fluorescent unit)
g	Erdbeschleunigung $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
gDNA	genomische DNA
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
<i>H. polygyrus</i>	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>
H1-/H2-Rezeptoren	Histaminrezeptoren Typ 1/Typ 2
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBDQ	Inflammatory Bowel Disease Quality of Life Index
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L3	dritte Larven
Le ^x LNFP III	LewisX-haltige Lacto-n-fucopentaose III
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
M	molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	normal
<i>N. americanus</i>	<i>Necator americanus</i>

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
<i>O. ochengi</i>	<i>Onchocerca ochengi</i>
<i>O. volvolus</i>	<i>Onchocerca volvolus</i>
PBL	periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PG	Prostaglandin
pH	pondus Hydrogenii
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RIN	RNA Integritätsnummer (engl. RNA Integrity Number)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
S	Svedberg-Einheit
s	sense
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SCCAI	Simple Clinical Colitis Activity Index
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfat)
spp.	Spezies
<i>T. suis</i>	<i>Trichuris suis</i>
<i>T. trichiura</i>	<i>Trichuris trichiura</i>
<i>T. vulpis</i>	<i>Trichuris vulpis</i>
TBE Puffer	TRIS-Borat-EDTA Puffer

TBS Puffer	TRIS gepufferte Salzlösung (engl. TRIS Buffered Saline)
TGF- β	Transforming Growth Factor β
T _H	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM	Handelsmarke (engl. Trademark)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg} -Zellen	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
<i>U. stenocephala</i>	<i>Uncinaria stenocephala</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

I. Einleitung

Die canine atopische Dermatitis ist eine häufig auftretende Erkrankung in der Kleintierpraxis (LUND *et al.* 1999, SCOTT & PARADIS 1990) und kann als Tiermodell für die humane Form der Krankheit dienen (NUTTALL *et al.* 2002a, PUCHEU-HASTON *et al.* 2008). Definitionsgemäß ist die atopische Dermatitis eine entzündliche und juckende, allergische Erkrankung der Haut mit charakteristischen klinischen Merkmalen und genetischer Prädisposition. In den meisten Fällen ist sie mit dem Auftreten von IgE-Antikörpern gegen Umweltallergene verbunden (OLIVRY *et al.* 2001a).

Die Diagnose der caninen atopischen Dermatitis basiert auf einer kompatiblen Vorgeschichte und den klassischen klinischen Symptomen (ZUR *et al.* 2002a). 1986 setzte WILLEMSE Haupt- und Nebenkriterien für die Diagnose der atopischen Dermatitis des Hundes fest (WILLEMSE 1986), die in der Veterinärdermatologie weithin anerkannt sind. Mögliche Differentialdiagnosen müssen im Vorfeld der Diagnosestellung ausgeschlossen werden (DEBOER & HILLIER 2001).

Das erfolgreiche Management caniner atopischer Dermatitis kann eine Kombination verschiedener Therapien einbeziehen. Hierzu gehört die Behandlung mit Glukokortikoiden (OLIVRY & MUELLER 2003, OLIVRY & SOUSA 2001b), Antihistaminika (OLIVRY & MUELLER 2003), Zyklosporin (OLIVRY & MUELLER 2003, STEFFAN *et al.* 2006), essentiellen Fettsäuren (BOND & LLOYD 1992, HARVEY 1999, MUELLER *et al.* 2004, OLIVRY *et al.* 2001b) und topischen Medikamenten (OLIVRY & MUELLER 2003) sowie die allergen-spezifische Immuntherapie (GRIFFIN & HILLIER 2001, OLIVRY & SOUSA 2001a).

Beim Menschen wurde über einen schützenden Effekt von Helminthen gegen Atopie berichtet (COOPER *et al.* 2003, COOPER *et al.* 2004). Atopische Erkrankungen zeigen eine niedrigere Prävalenz in Entwicklungsländern als in Industrieländern (ISAAC 1998). Helmintheninfektionen werden dabei negativ mit Atopie und der Prävalenz allergischer Krankheiten assoziiert (CARVALHO *et al.* 2006). Asthmapatienten, die mit *Schistosoma (S.) mansoni* infiziert sind, zeigen eine mildere Symptomatik der Erkrankung (MEDEIROS *et al.* 2003). Sowohl Helmintheninfektionen als auch Allergien induzieren eine T_H2-Immunantwort. Während es jedoch bei Allergien zu einer klinischen Reaktion kommt, wird der Wirt bei Helmintheninfektionen durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β weitgehend vor pathologischen Reaktionen bewahrt. Die ge-

nannten Zytokine könnten sich schützend gegen Allergien auswirken (CARVALHO *et al.* 2006). Der protektive Effekt von Helminthen durch Modulation des Immunsystems wird von verschiedenen Modellen bei Mäusen (BASHIR *et al.* 2002, ELLIOTT *et al.* 2003, ELLIOTT *et al.* 2004, KHAN *et al.* 2002, LIMA *et al.* 2002, MANGAN *et al.* 2004), Schweinen (HURST *et al.* 2006) und Rindern (GRAHAM *et al.* 2001) gestützt.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Daten über die Immunmodulation durch Helminthen bei Hunden mit atopischer Dermatitis. Das Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob *Trichuris (T.) vulpis* oder *Uncinaria (U.) stenocephala* einen immunmodulierenden Effekt bei atopischen Hunden induzieren und ob gegebenenfalls solch eine Wirkung mit einer Veränderung klinischer Symptome, geänderter Histopathologie oder verändertem kutanem Zytokinprofil einhergeht.

II. Literaturübersicht

2.1. Atopische Dermatitis

2.1.1. Einführung

Die humane atopische Dermatitis ist ein wichtiges Gesundheitsproblem, das bis zu 20 % der Kinder weltweit betrifft. In Industrieländern tritt diese Krankheit weitaus häufiger auf als in Entwicklungsländern (WILLIAMS *et al.* 1999). Die Verbreitung nimmt seit dem zweiten Weltkrieg ununterbrochen zu (LEUNG 1999). Annähernd 90 % aller Patienten erkranken während der ersten fünf Lebensjahre an atopischer Dermatitis (LEUNG 2000). Hinzu kommt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung anderer atopischer Krankheiten (SPERGEL & PALLER 2003). Fast 80 % der von atopischer Dermatitis betroffenen Kinder zeigen irgendwann allergische Rhinitis oder Asthma, was auf Gemeinsamkeiten in der Pathogenese schließen lässt (LEUNG 2000). Der individuelle Verlauf ist schwer zu prognostizieren. Die Lebensqualität sowohl der Patienten als auch ihrer Familien leidet erheblich (SPERGEL & PALLER 2003).

Neben genetischen Faktoren spielen immunologische Vorgänge und Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der atopischen Dermatitis (MARSELLA & OLIVRY 2003). Die sogenannte „Hygiene-Hypothese“ besagt, dass verringerter Infektionsdruck in der Kindheit das Risiko des Auftretens allergischer Krankheiten erhöht (RAMSEY & CELEDON 2005). Verschiedene Mikroorganismen und Infektionen wurden in der Vergangenheit damit in Zusammenhang gebracht (RAUTAVA *et al.* 2004). Dabei rücken Parasiten immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Helminthen wird in zahlreichen Studien ein protektiver Effekt gegen Atopie zugesprochen (ARAUJO *et al.* 2000, CARVALHO *et al.* 2006, COOPER *et al.* 2003, COOPER *et al.* 2004, VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2000) und eine anthelminthische Therapie scheint zu gesteigerter allergischer Sensitivität zu führen (LYNCH *et al.* 1993, VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2004).

Auch bei Haustieren und hierbei vor allem beim Hund tritt die atopische Dermatitis häufig auf. Wegen zahlreicher Ähnlichkeiten wurde der Hund daher oft als natürlich auftretendes Tiermodell für die humane Form der Krankheit herangezogen (MARSELLA & OLIVRY 2003). Die canine atopische Dermatitis gehört zu den wichtigsten Vorstellungsgründen in der Praxis (LUND *et al.* 1999, SCOTT & PARADIS 1990). Etwa 10 % aller Hunde sind von der Krankheit betroffen (SCOTT

et al. 2001). Erste Symptome treten verschiedenen Berichten zufolge klassischerweise im Alter zwischen sechs Monaten und drei Jahren auf (GRIFFIN & DEBOER 2001). Das Auftreten der Symptome bei jüngeren Hunden und nach dem siebten Lebensjahr ist eher selten (GRIFFIN 1993, NESBITT *et al.* 1984, SARIDOMICHELAKIS *et al.* 1999, SCOTT *et al.* 2001). Die Symptome können saisonal oder ganzjährig bestehen (GRIFFIN & DEBOER 2001). Die betroffenen Hunde werden hauptsächlich wegen Juckreiz und wegen durch Selbsttrauma bedingten Hautläsionen vorgestellt. Neben der atopischen Dermatitis tritt häufig gleichzeitig eine Flohspeichelallergie auf. Etwa 7 % der Patienten zeigen zusätzlich eine Futtermittelunverträglichkeit (ZUR *et al.* 2002a).

In der Humanmedizin findet sich bei atopischer Dermatitis eine T_H2 -Polarisation des Immunsystems mit Produktion der dazu gehörigen Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) (KONING *et al.* 1997a, KONING *et al.* 1997b, VAN REIJSEN *et al.* 1992). Dieser wird bei der Immunpathogenese der Krankheit große Bedeutung zugemessen (KAY *et al.* 1991, PLAUT 1990, WIERENGA *et al.* 1990). T_H1 -Zytokine (IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF- α) überwiegen dagegen in chronischen Hautläsionen (GREWE *et al.* 1998a, LEUNG & BIEBER 2003). Während T_H2 -Zytokine eine wichtige Rolle für die humorale Immunität und IgE-Produktion spielen, beeinflussen T_H1 -Zytokine die zellmedierte Immunität (ABBAS *et al.* 1996). Sogenannte regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) produzieren IL-10 und TGF- β , wodurch die IgE-Produktion erheblich gemindert wird (AKDIS *et al.* 2005). Die Entstehung der Läsionen bei Patienten mit atopischer Dermatitis resultiert vermutlich aus einer sukzessiven Aktivierung von T_H2 - und T_H1 -Zellen (GREWE *et al.* 1998a). Einige Untersuchungen zur Zytokinproduktion in der Haut bei Hunden mit atopischer Dermatitis sprechen auch hier für eine T_H2 -Polarisation des Immunsystems (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b, OLIVRY *et al.* 1999).

Bei den meisten Patienten mit atopischer Dermatitis kommt es zur Bildung von IgE-Antikörpern gegen bestimmte Umweltallergene. Juckreiz und charakteristische klinische Symptome treten auf (OLIVRY *et al.* 2001a).

2.1.2. Klinik der caninen atopischen Dermatitis

Atopische Dermatitis tritt bei 95 % der Hunde erstmals vor dem fünften Lebensjahr auf. Am häufigsten wird die Krankheit beim Labrador Retriever, Golden Retriever, Deutschen Schäferhund, Cocker Spaniel und West Highland White Terrier diagnostiziert (ZUR *et al.* 2002a). Allerdings können sich Rasseprädispositionen im Laufe der Zeit verändern (GRIFFIN & DEBOER 2001).

Anfängliche klinische Symptome sind bei 42 – 75 % der Patienten saisonal (HALLIWELL 1971, SCOTT 1981). Allerdings kann die Krankheit, abhängig von den involvierten Allergenen, auch von Beginn an ganzjährig auftreten. Der häufigste Befund beim Hund wie auch beim Menschen mit atopischer Dermatitis ist Juckreiz (GRIFFIN & DEBOER 2001). Typische Lokalisationen, an denen Juckreiz auftritt, sind das Gesicht, die Ohren, die distalen Extremitäten und das Ventrum. Dabei kann jede Körperregion einzeln oder Kombinationen verschiedener Regionen betroffen sein. 40 oder mehr Prozent der betroffenen Hunde zeigen generalisierten Juckreiz (GRIFFIN & DEBOER 2001, NESBITT *et al.* 1984, SCOTT 1981).

Atopische Dermatitis kann beim Hund ohne Primärläsionen auftreten (HALLIWELL 1971, SCOTT 1981). Die Verteilung der Läsionen am Körper ist unabhängig von der Art der Allergenexposition (oral, epikutan, Inhalation). Dabei scheint die epidermale Allergeneinwirkung die größte klinische Bedeutung zu haben (MARSELLA *et al.* 2006). Die auftretenden Sekundärläsionen spiegeln den chronischen Juckreiz und das damit einhergehende Trauma sowie die chronische Entzündung und die oft die Krankheit begleitenden Sekundärinfektionen wider (GRIFFIN & DEBOER 2001). Zu den Sekundärläsionen gehören selbstinduzierte Alopezie, Hyperpigmentation, Exkorationen und Lichenifikation (SCOTT 1981). Etwa 60 % der atopischen Hunde sind von Otitis externa betroffen (ZUR *et al.* 2002a). 50 % der Hunde haben eine Konjunktivitis (SCOTT 1981). Seborrhoe, Hyperhidrose, sekundäre bakterielle Infektionen und sekundäre Infektionen mit *Malassezia* können das Krankheitsbild der caninen atopischen Dermatitis weiter komplizieren (SCOTT *et al.* 2001). Fast 70 % der betroffenen Hunde leiden unter sekundären Pyodermien (GRIFFIN 1993). Die canine atopische Dermatitis kann auch in Verbindung mit einer Futtermittelallergie oder einer Flohspeichelallergie auftreten (ZUR *et al.* 2002a).

2.1.3. Diagnose der caninen atopischen Dermatitis

Beim Hund wie auch beim Menschen sind die klinischen Symptome der atopischen Dermatitis vielfältig. Die atopische Dermatitis des Hundes ist immer eine Ausschlussdiagnose. Zusätzliche Untersuchungen wie Intrakutantest, Serum-Allergietest und histopathologische Beurteilung von Hautbiopsien können die Diagnose bekräftigen. Die Diagnose selbst basiert auf dem Vorhandensein klinischer Symptome und dem Ausschluss relevanter Differentialdiagnosen. Hierzu gehören vor allem Flohspeichelallergie, Futtermittelallergie, parasitäre Hautkrankheiten wie Sarkoptesräude oder andere juckende Milbeninfestationen, bakterielle Follikulitis und Malassezien-Dermatitis (DEBOER & HILLIER 2001).

Flohspeichelallergie ist die am häufigsten vorkommende Allergie bei Hunden. Dabei müssen keine Flöhe auf dem Tier gefunden werden. Die endgültige Diagnose basiert auf der Historie, der klinischen Untersuchung und einer adäquaten Flohkontrolle (SCOTT *et al.* 2001).

Die Futtermittelallergie ist eine nicht saisonale, juckende Krankheit der Haut. Sie ist nach der Flohspeichel- und Umweltallergie (Atopie) die dritthäufigste Allergie bei Hunden. Eine klinische Unterscheidung von der durch Umweltantigene verursachten Atopie ist nicht möglich. Die Diagnose einer Futtermittelallergie kann derzeit nur mit der Durchführung einer Eliminationsdiät und anschließender Provokationsprobe gestellt werden (SCOTT *et al.* 2001).

Sarkoptesräude verursacht bei Hunden einen extremen Juckreiz. Die Milben können gelegentlich in oberflächlichen Hautgeschabseln entdeckt werden, allerdings schließen negative Geschabsel deren Vorkommen beim Hund nicht aus (MUELLER *et al.* 2001). Häufig wird dann von einem Therapieversuch mit akariziden Medikamenten als diagnostischem Test Gebrauch gemacht (CURTIS 2004).

Hunde mit atopischer Dermatitis neigen dazu, Sekundärinfektionen, vor allem mit *Staphylococcus intermedius* oder *Malassezia pachydermatis*, zu entwickeln (OLIVRY & SOUSA 2001a). Die Anhaftung des Keimes *Staphylococcus intermedius* an die Korneozyten atopischer Hunde ist signifikant höher als die bei gesunden Hunden. Außerdem ist die Adhärenz bei starkem Juckreiz bedeutend größer als bei wenig Juckreiz (SIMOU *et al.* 2005). Malassezien-Dermatitis ist ebenfalls ein häufiger Befund bei atopischen Hunden. Dies unterstreicht die Bedeutung der Zytologie bei der Aufarbeitung eines Patienten mit Juckreiz (ZUR *et al.* 2002a).

Haut- oder Serumtests sind nicht zur Diagnose der caninen atopischen Dermatitis geeignet. Studien mit atopischen und gesunden Hunden haben gezeigt, dass viele gesunde Hunde positive Hauttestreaktionen und allergen-spezifisches Serum-IgE gegen Milbenantigene zeigen (CODNER & LESSARD 1993, MUELLER *et al.* 2005). Positive Testreaktionen sind ausschließlich zur Identifizierung relevanter Allergene geeignet, wenn die atopische Dermatitis bereits diagnostiziert wurde.

2.1.4. Therapie der caninen atopischen Dermatitis

Die Therapie der caninen atopischen Dermatitis beruht sehr oft auf einer Kombinationstherapie. Hierbei spielen Allergenvermeidung, anti-inflammatorische Medikation, allergen-spezifische Immuntherapie und die Behandlung von Sekundärinfektionen eine wichtige Rolle. Eine Elimination oder Minimierung der beteiligten Allergene ist natürlich ideal, aber nicht immer umsetzbar. Hilfreich kann hier häufiges Baden, vor allem nach dem Spazierengehen, sein, um an der Haut anhaftende Allergene abzuwaschen. Wann immer Allergenvermeidung nicht möglich ist, können entzündungshemmende Medikamente zum Einsatz kommen. Die einzig spezifische Therapieform stellt derzeit die allergen-spezifische Immuntherapie dar. Da Hunde mit atopischer Dermatitis dazu neigen, Sekundärinfektionen zu entwickeln, ist die Behandlung vorhandener Infektionen ein unverzichtbarer Bestandteil der Therapie der caninen Atopie (OLIVRY & SOUSA 2001a). Aufgrund des häufigen Vorkommens einer zusätzlichen Flohspeichelallergie bei Hunden mit Atopie (ZUR *et al.* 2002a) kann eine effektive Flohkontrolle zu einer besseren Toleranz gegenüber anderen Umweltallergenen beitragen (MARSELLA & SOUSA 2001).

2.1.4.1. Glukokortikoide

Glukokortikoide gehören zu den am häufigsten verwendeten entzündungshemmenden Medikamenten (OLIVRY & SOUSA 2001b). Der hauptsächliche anti-inflammatorische Effekt beruht auf dem Zusammenspiel mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (BARNES 1998, DE BOSSCHER *et al.* 2000). Dadurch wird die Expression zahlreicher pro-entzündlicher Gene (Zytokine, Enzyme, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle) unterdrückt (BARNES 1998).

In Doppelblindstudien mit oralen Glukokortikoiden zeigte sich eine mediane Reduktion der Läsionen um bis zu 83 % und des Juckreizes um bis zu 81 %. Bei über 40 % der behandelten Hunde reduzierte sich der Juckreiz um mehr als die Hälfte (OLIVRY & MUELLER 2003).

Bei oraler Glukokortikoid-Therapie kann eine Reihe von Nebenwirkungen auftreten. Hierzu gehören Polyurie, Polydipsie, Polyphagie und Gewichtszunahme, intermittierende gastrointestinale Symptome und das Auftreten von Sekundärinfektionen (OLIVRY & MUELLER 2003). Es können aber auch lebensbedrohliche Zustände durch Pankreatitis, gastrointestinale Ulzera oder Infektionen mit opportunistischen Keimen eintreten (OLIVRY & SOUSA 2001b). Außerdem birgt die Langzeitverabreichung oraler Glukokortikoide bei allergischen Hautkrankheiten fast unvermeidlich die Gefahr des Auftretens bakterieller Harnwegsinfektionen. Bei fast 40 % dieser Hunde finden sich Infektionen des Harntraktes (IHRKE *et al.* 1985).

Die Wirksamkeit topischer Glukokortikoid-Formulierungen bei caniner atopischer Dermatitis ist bisher wenig untersucht (OLIVRY & SOUSA 2001b). In den Vereinigten Staaten ist ein Triamzinolonspray auf dem Markt, welches in einer Studie bei Hunden mit Juckreiz sehr wirksam war. Beobachtete Nebenwirkungen waren hierbei Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, vermehrtes Schuppen und Haaren sowie gastrointestinale Symptome (DEBOER *et al.* 2002). Seit kurzem befindet sich eine neuartige topische Formulierung in Form eines Sprays im Handel, das Hydrocortison-Aceponat enthält (Cortavance[®], Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland). Dieses Glukokortikoid der vierten Generation wird hauptsächlich in der Haut abgebaut und minimiert damit die systemischen Wirkungen. Langzeitstudien liegen allerdings beim Hund bisher nicht vor.

2.1.4.2. Zyklusporin

Die entzündungshemmende Wirkung von Zyklusporin A beruht vor allem auf der Unterdrückung der Aktivierung verschiedener Zellen, die am kutanen allergischen Entzündungsgeschehen beteiligt sind (MARSELLA & OLIVRY 2001). Das biologische Ziel von Zyklusporin A ist Calcineurin. Alle therapeutischen, aber auch toxischen Effekte beruhen auf der Hemmung von Calcineurin (HO *et al.* 1996). Zyklusporin beeinflusst sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort. Es blockiert effektiv die Aktivierung vieler Schlüsselzellen der kutanen allergischen Entzündung wie Mastzellen, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Langerhans-

Zellen und Keratinozyten (MARSELLA 2005). Zyklosporin hemmt außerdem die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen (SCHREIBER & CRABTREE 1992).

In Studien, in denen atopische Hunde mit Zyklosporin A behandelt wurden, zeigte sich eine ausgeprägte Reduktion des Juckreizes und der Läsionen (STEFFAN *et al.* 2006). Beschriebene Nebenwirkungen des Zyklosporins sind Erbrechen, Durchfall, Anorexie, Gewichtsverlust, kutane Papillomatose, chronische hyperplastische Gingivitis und Periodontitis (MARSELLA & OLIVRY 2001). In prospektiven Studien waren Erbrechen mit 25 % und Durchfall mit 15 % die häufigsten Nebenwirkungen. Andere Nebenwirkungen traten mit einer Häufigkeit von unter 2 % auf. Es zeigte sich, dass der Therapieerfolg von Zyklosporin bei caniner atopischer Dermatitis vergleichbar dem von Glukokortikoiden ist, allerdings mit anderen Nebenwirkungen (STEFFAN *et al.* 2006).

Tacrolimus, ein topisch angewendeter Calcineurin-Inhibitor, hat einen sehr ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Zyklosporin. Das Präparat zeigt gute Wirksamkeit und ist mit einem geringen Nebenwirkungsrisiko verbunden (MARSELLA 2005).

2.1.4.3. Antihistaminika

Antihistaminika entfalten ihre Wirkung in verschiedenen Geweben durch die Blockade von spezifischen Histaminrezeptoren, vor allem H1- und H2-Rezeptoren. Histamin-induzierte Effekte an H1-Rezeptoren sind Juckreiz, Schmerz und erhöhte Permeabilität der Blutgefäße. Die hauptsächlichen Effekte von Histamin an H2-Rezeptoren sind eine verstärkte Magensäureproduktion sowie eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Der prinzipielle Wirkungsmechanismus von Antihistaminika, die therapeutisch bei humanen allergischen Hautkrankheiten eingesetzt werden, beruht auf einem H1-Rezeptor-Antagonismus und damit der Beeinflussung von Juckreiz und erhöhter Gefäßpermeabilität. Generell wird angenommen, dass die Wirkung beim Hund ähnlich ist (DEBOER & GRIFFIN 2001).

Manche Antihistaminika zeigen Wirkungen auf das zentrale Nervensystem, wie etwa Sedation. Dies könnte einen Teil der therapeutischen Effekte mit erklären. Nur wenige Wirkstoffe, die klinische Anwendung bei caniner atopischer Dermatitis finden, wurden eingehend auf ihre Wirksamkeit untersucht (DEBOER & GRIFFIN 2001). In Studien bei Hunden konnte eine Reduktion des Juckreizes durch Hydroxyzin, Chlorpheniramin oder Diphenhydramin nachgewiesen werden (PATERSON 1994, SCOTT & BUERGER 1988). Die klinische Wirksamkeit von Antihistaminika

kann durch Kombination mit essentiellen Fettsäuren verbessert werden (PATERSON 1995).

Nebenwirkungen bei Hunden sind gewöhnlich eher mild und umfassen unter anderem Sedation, anticholinergische Effekte, Zittern, Ataxie, Hyperästhesie, vermehrtes Speicheln, erhöhten Juckreiz, Hecheln und Erregung. Die Wirksamkeit variiert von Patient zu Patient und von Wirkstoff zu Wirkstoff. Daher ist es oft nötig, bei einem Patienten verschiedene Präparate auszuprobieren. Es kann sieben bis 14 Tage dauern bis sich ein Effekt zeigt (DEBOER & GRIFFIN 2001).

2.1.4.4.Essentielle Fettsäuren

Essentielle Fettsäuren entfalten ihre Wirkung auf die allergisch bedingte Entzündung durch die Modulation der Leukotrien- und Prostaglandin-Produktion, durch die Hemmung zellulärer Aktivierung und Zytokinsekretion sowie durch eine Veränderung des Aufbaus und der Funktion der epidermalen Lipidbarriere (OLIVRY *et al.* 2001b). Omega-6- (Gamma-Linolensäure) und Omega-3-Fettsäuren (Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure) besitzen entzündungshemmende und immunmodulatorische Wirkungen auf die Haut. Sie modulieren die Produktion der Eikosanoide, indem sie mit Arachidonsäure um die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase in der Arachidonsäurekaskade konkurrieren. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Produktion von Leukotrienen und Prostaglandinen mit anti-inflammatorischen Eigenschaften (LT5, PG3) anstelle von pro-inflammatorischen Leukotrienen und Prostaglandinen (LT4, PG2). Essentielle Fettsäuren hemmen die Proliferation und Aktivierung von Lymphozyten. Außerdem wird durch sie die Synthese entzündungsfördernder Zytokine reduziert (ABBA *et al.* 2005). Neuere Studien belegen bei Hunden mit atopischer Dermatitis eine direkte Proliferationshemmung von Lymphozyten (STEHLE *et al.* 2007).

Die Verabreichung von essentiellen Fettsäuren bei caniner Atopie bewirkt oftmals eine Besserung oder gar Remission des Juckreizes (BOND & LLOYD 1992, HARVEY 1999). Etwa 10 – 20 % der Patienten mit Juckreiz werden durch alleinige Therapie mit Fettsäuren symptomfrei (MUELLER *et al.* 2004). Hunde, die sich in einem frühen Stadium der atopischen Dermatitis befinden, sprechen besser auf die Gabe essentieller Fettsäuren an als Patienten, die chronisch betroffen sind (ABBA *et al.* 2005).

Durch Verabreichung von essentiellen Fettsäuren kann ein sogenannter „steroidsparender Effekt“ bei Hunden mit atopischer Dermatitis erzielt werden. Hierdurch kann die Dosierung von Glukokortikoiden gesenkt werden. Allerdings tritt dieser Effekt mit einer zeitlichen Verzögerung ein (SAEVIK *et al.* 2004).

2.1.4.5. Allergen-spezifische Immuntherapie

Die allergen-spezifische Immuntherapie wird seit vielen Jahren für die Behandlung der humanen und caninen atopischen Dermatitis eingesetzt. Sie wird für Hunde mit atopischer Dermatitis empfohlen, bei denen die relevanten Allergene mittels Intradermaltest oder Serum-Allergietest identifiziert wurden und Allergenkontakt unvermeidlich ist. Außerdem sollte die allergen-spezifische Immuntherapie in Betracht gezogen werden, wenn sich die symptomatische Therapie als erfolglos erweist oder mit untragbaren Nebenwirkungen verbunden ist (GRIFFIN & HILLIER 2001). Definitionsgemäß handelt es sich bei der allergen-spezifischen Immuntherapie um die Verabreichung graduell steigender Dosen eines Allergenextrakts an einen allergischen Patienten, um die Symptome, die mit einer Allergenexposition verbunden sind, zu mildern (BOUSQUET *et al.* 1998).

Der exakte Wirkungsmechanismus ist noch nicht geklärt (GRIFFIN & HILLIER 2001). Bei atopischen Hunden führt die allergen-spezifische Immuntherapie durch erhöhte IFN- γ Expression zu einer Verschiebung in Richtung T_H1-Immunantwort (SHIDA *et al.* 2004). Es kommt zu einem signifikanten Anstieg der T_{reg}-Zellen und der Serumkonzentration von IL-10 (KEPPEL *et al.* 2008). Außerdem ist eine Zunahme von allergen-spezifischem IgG beschrieben (HITES *et al.* 1989).

In der Literatur werden unterschiedliche Erfolgsquoten für die allergen-spezifische Immuntherapie angegeben. Bei 50 – 100 % der Hunde, die dieser Therapie unterzogen werden, zeigt sich nach über vier Monaten eine mindestens 50%ige Verbesserung der klinischen Symptome (GRIFFIN & HILLIER 2001). Weder das Alter, in dem die atopische Dermatitis zuerst auftritt, noch das Alter, in dem mit der allergen-spezifischen Immuntherapie begonnen wird, beeinflussen die Erfolgsrate (ZUR *et al.* 2002b).

Selten treten Nebenwirkungen auf die allergen-spezifische Immuntherapie bei Hunden auf. Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen gehören eine Verschlimmerung der klinischen Symptome und des Juckreizes (GRIFFIN & HILLIER 2001).

2.2. *Trichuris vulpis*

2.2.1. Vorkommen und Entwicklung

Nematoden der Art *T. vulpis* sind die Erreger der Trichuriose bei Karnivoren (KIRKOVA & DINEV 2005). Hauptsächlich findet man sie im Zäkum, wo sie sich in der Mukosa festsetzen (JACOBS 1984). *T. vulpis* besitzt einen direkten Entwicklungszyklus. Karnivoren infizieren sich nur nach der Aufnahme von Eiern, die eine infektiöse Larve enthalten. In der Literatur existieren widersprüchliche Daten über die weitere Entwicklung von *T. vulpis* im Wirt. Die meisten Studien gehen davon aus, dass aus den infektiösen Eiern im Dünndarm die Larven schlüpfen. Diese dringen in die Lieberkühnschen Krypten des Darmes ein und verweilen dort für zwei bis zehn Tage. Danach erfolgt die Besiedlung des Zäkums und Kolons, wo sie sich mit ihrem Vorderende in der Darmschleimhaut verankern (KIRKOVA & DINEV 2005). Die durchschnittliche Präpatenz (Zeit von der Aufnahme infektiöser Eier bis zur ersten Nachweismöglichkeit von Eiern der nächsten Generation im Kot des Wirtes) beträgt etwa drei Monate (im Mittel 82 Tage), die Lebensdauer der Parasiten im Wirt circa 16 Monate (RUBIN 1954). Die Eier werden intermittierend mit dem Kot ausgeschieden. Die Embryonierung der Eier erfolgt sehr langsam (JACOBS 1984). Bei Temperaturen von 19,3 – 26,4 °C und genügend Feuchtigkeit dauert die Embryonierung etwa vier Wochen (25 – 26 Tage). Bei tieferen Temperaturen (4,4 – 5,3 °C) kommt es nicht zur Embryonierung der Eier. Diese bleiben jedoch entwicklungsfähig (RUBIN 1954). Im Boden können die Eier jahrelang überleben (JACOBS 1984). In einer aktuellen Untersuchung zum Befall mit *T. vulpis* bei Hunden in Deutschland waren 1,2 % von 7113 Kotproben positiv (BARUTZKI & SCHAPER 2003).

2.2.2. Pathogenese und Klinik der Trichuriose beim Hund

T. vulpis findet man hauptsächlich im Zäkum (JACOBS 1984), bei starkem Befall auch im gesamten Dickdarm. Die Würmer sind mit ihrem gestreckten dünnen Ende in der Epithelschicht der Darmschleimhaut verankert. Das dickere, kurze Ende ragt in das intestinale Lumen. KIRKOVA und DINEV (2005) infizierten Hunde in einer Dosis von 20000 Eiern/kg KGW mit *T. vulpis*-Eiern. Es zeigten sich mechanische Schädigungen der Darmmukosa, ausgedehnte lokale Entzündungen und Hämorrhagien (KIRKOVA & DINEV 2005). Infektionen sind häufig asymptomatisch. Allerdings kann es auch zu Gewichtsverlust und intermittierendem Durchfall kommen (JACOBS 1984). In seltenen Fällen können schwerwiegendere Symptome wie Apa-

thie, Anorexie, chronischer Durchfall, Polydipsie, Polyurie und Elektrolytverschiebungen auftreten (RUCKSTUHL *et al.* 2002). Studien mit *T. suis* an Schweinen belegen die Entwicklung einer guten protektiven Immunität bei Reinfektionen (PEDERSEN & SAEED 2001). Für die Entwicklung einer Immunität spricht auch, dass die Prävalenz einer *T. vulpis*-Infektion bei Hunden bis zu einem Jahr signifikant höher ist als bei älteren Hunden (BARUTZKI & SCHAPER 2003).

2.2.3. Diagnose

Patente Infektionen mit *T. vulpis* können durch den Nachweis der charakteristischen bipolaren Eier im Kot diagnostiziert werden (FISHER 2001). Das spezifische Gewicht der Eier von *T. vulpis* liegt bei 1,1453 (DAVID & LINDQUIST 1982). Für den Nachweis mittels Flotation muss das spezifische Gewicht der verwendeten Flotationslösung höher sein als das der Eier (DRYDEN *et al.* 2005).

2.2.4. Zoonosepotential

Infektionen beim Menschen sind sehr selten beschrieben. In einer neueren Fallstudie zeigte die Patientin unspezifische gastrointestinale Symptome (abdominale Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Durchfall). Im Kot wurden Eier von *T. vulpis* nachgewiesen (DUNN *et al.* 2002). Daneben existieren ältere Einzelberichte über eine viszerale *Larva migrans* im Zusammenhang mit *T. vulpis* (MASUDA *et al.* 1987, SAKANO *et al.* 1980). Diese Einzelberichte sind allerdings sehr selten. Daher ist von einem extrem geringen Infektionspotential für den Menschen auszugehen.

2.3. *Uncinaria stenocephala*

2.3.1. Vorkommen und Entwicklung

Der Hakenwurm *U. stenocephala* parasitiert bei Hunden, Füchsen und anderen Karnivoren (CLAPHAM 1962). Er lebt im Dünndarm und scheidet dort die Eier aus. Normalerweise entwickeln sich patente Infektionen nur, wenn infektiöse Larven verschluckt werden. Allerdings kann es durch Penetration der Haut zu Dermatitiden kommen, vor allem zwischen den Zehen (JACOBS 1984). *U. stenocephala* besitzt einen monoxenen (einwirtigen) Entwicklungszyklus (CLAPHAM 1962). Die infektiösen dritten Larven (L3) wandern nach oraler Aufnahme in die Schleimhaut von Magen und Dünndarm. Im Anschluss erfolgt die Ansiedlung im Dünndarm, wo sie sich zu geschlechtsreifen Stadien weiterentwickeln (STOYE 1983). Die Präpatenz beträgt etwa 15 Tage (FISHER 2001). Im Freien schwankt die Entwicklungszeit vom

Ei bis zum infektiösen Stadium L3 temperaturabhängig zwischen einer Woche (im Sommer) und bis zu fünf Monaten (im Winter) (WALKER & JACOBS 1981). Auf feuchten Flächen und im Erdboden können die infektiösen Larven monatelang überleben (STOYE 1983). Bei einer aktuellen Untersuchung zum Hakenwurmbefall bei Hunden in Deutschland waren 2,8 % von 7113 Hundekotproben positiv. Hierbei wurde allerdings nicht zwischen den Hakenwurmeiern differenziert (BARUTZKI & SCHAPER 2003).

2.3.2. Pathogenese und Klinik der Uncinariose beim Hund

Hinsichtlich der Pathogenese und Klinik bei Hunden hat *U. stenocephala* eine geringere Bedeutung als *Ancylostoma caninum* (CLAPHAM 1962, JACOBS 1984). Dies mag auch daran liegen, dass *Uncinaria* in der Mundkapsel nur Schneidplatten mit glattem Rand trägt, während *Ancylostoma* zahnartige Strukturen aufweist (CLAPHAM 1962). Im Gegensatz zu *Ancylostoma caninum* ernährt sich *U. stenocephala* nicht von Blut. Dennoch kann es zu Durchfall und einer Enteropathie mit Proteinverlust kommen (JACOBS 1984). Klinische Erkrankungen treten jedoch selten (CLAPHAM 1962) und fast ausschließlich bei jungen Tieren auf, da es im Verlauf der Infektion zur Entwicklung einer Immunität kommt (STOYE 1983).

2.3.3. Diagnose

Die Eier von *U. stenocephala* lassen sich bei patentem Befall koproskopisch nachweisen (STOYE 1983).

2.3.4. Zoonosepotential

Infektionen durch *U. stenocephala* sind beim Menschen selten beschrieben. Im Freien beträgt die Entwicklungszeit infektiöser Larven eine Woche bis hin zu fünf Monaten (WALKER & JACOBS 1981). Erst danach besteht das Risiko einer Infektion, das durch allgemeine Hygienemaßnahmen (Hände waschen, Entfernen des Hundekotes) stark minimiert wird. Hakenwurmlarven können jedoch beim Menschen ein als *Larva migrans cutanea* bezeichnetes Krankheitsbild hervorrufen. Dabei handelt es sich um einen selbstlimitierenden Hautausschlag, der durch kutane Penetration der Larven entsteht. Der Mensch ist ein Fehlwirt (BLACKWELL & VEGA-LOPEZ 2001). Der Lebenszyklus kann im menschlichen Wirt nicht abgeschlossen werden und die Larven sterben (MEINKING *et al.* 2003). Die Läsionen verheilen nach einiger Zeit spontan (RIVERA-ROIG *et al.* 2008). Die Krankheit tritt

häufiger in wärmeren Klimazonen (Afrika, Karibik, Südostasien) mit weniger guter Hygienepaxis auf (BLACKWELL & VEGA-LOPEZ 2001).

2.4. Immunmodulation durch Helminthen bei allergischen Krankheiten

2.4.1. Helminthen und Allergien

Helmintheninfektionen und allergische Krankheiten treten weltweit häufig auf. Hunderte Millionen von Menschen beherbergen Helminthen als Parasiten (CHITSULO *et al.* 2000, DE SILVA *et al.* 2003). Dabei erscheint es unwahrscheinlich, dass die Prävalenz der durch sie verursachten Infektionen in naher Zukunft abnimmt (DE SILVA *et al.* 2003). Zu den am häufigsten vorkommenden Helminthosen gehören durch *Ascaris (A.) lumbricoides*, *T. trichiura*, *Necator (N.) americanus*, *Ancylostoma duodenale* und *Schistosoma* spp. hervorgerufene Infektionen. In den verarmten Gegenden der Tropen und Subtropen sind die Einwohner oft chronisch und nicht selten mit mehreren Helminthenspezies infiziert (HOTEZ *et al.* 2008).

Die Prävalenz und der Schweregrad allergischer Krankheiten haben in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen. In den Industrieländern sind geschätzte 20 % der Bevölkerung betroffen (NAUTA *et al.* 2008). 130 Millionen Menschen weltweit leiden alleine an Asthma (SEARS 1997).

Epidemiologische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass Infektionen mit bestimmten Helminthenspezies negativ mit der Prävalenz allergischer Krankheiten korrelieren (SEREDA *et al.* 2008). Laut der „International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)“ treten Asthma und andere allergische Krankheiten weitaus häufiger in Industrieländern als in Entwicklungsländern auf (ISAAC 1998). Diese Beobachtung, dass Allergien in Entwicklungsländern, vor allem in ländlichen Gegenden, weniger auftreten, hat in der Wissenschaft großes Interesse daran geweckt, Umweltfaktoren, die mit einem Schutz gegen allergische Krankheiten verbunden sein könnten, zu identifizieren (YAZDANBAKHSI & WAHYUNI 2005). Mehrere Studien belegen nachhaltig, dass Umweltfaktoren bei der Entwicklung von Allergien eine Rolle spielen. Dabei ist der Einfluss von Infektionen auf die Prävalenz und den Schweregrad allergischer Krankheiten von großem Interesse. Es existieren zahlreiche Publikationen, wonach Infektionen vor Atopie schützen können (CARVALHO *et al.* 2006). Sehr viele Studien sprechen dabei Helminthen einen protektiven Effekt zu (ARAUJO *et al.* 2000, COOPER *et al.* 2003, COOPER *et al.* 2004, HAGEL *et al.* 1993, LYNCH *et al.* 1993, VAN DEN

BIGGELAAR *et al.* 2000). Kinder aus Gebieten in Venezuela mit hohem Aufkommen von Helmintheninfektionen, vor allem mit *A. lumbricoides*, zeigen nur geringe positive Hauttestreaktionen auf gewöhnliche Umweltallergene (HAGEL *et al.* 1993). Auch COOPER *et al.* (2003) belegten in einer Untersuchung an 2865 Kindern aus Ecuador im Schulalter (fünf bis 19 Jahre), dass aktive Infektionen mit Helminthen negativ mit der Reaktivität im Hauttest gegenüber Allergenen korrelieren (COOPER *et al.* 2003). Vergleichbare Ergebnisse brachte eine Studie aus Gabun in Afrika. Hier zeigten die infizierten Kinder ebenfalls nur in sehr geringer Anzahl Reaktionen im Hauttest (VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2001). Die anthelminthische Therapie chronisch infizierter Kinder aus für Helminthen endemischen Gebieten führt außerdem zu einer erhöhten Hautreaktivität (VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2004). Daneben gibt es allerdings auch Untersuchungen, die dieser „Helminthen-These“ widersprechen (LYNCH *et al.* 1997, PALMER *et al.* 2002). Danach können Helmintheninfektionen in einer endemischen Situation sogar zu asthmatischen Symptomen beitragen (LYNCH *et al.* 1997). Eine andere Studie beschreibt ein erhöhtes Risiko für Asthma bei Kindern mit einer *A. lumbricoides*-Infektion (PALMER *et al.* 2002). Mögliche Erklärungen für diese unterschiedlichen Aussagen sind Unterschiede im Alter der Studienpopulation, der Wurmbürde, der Chronizität und der jeweiligen Helminthenspezies (CARVALHO *et al.* 2006). Im Falle von Helmintheninfektionen ist der Kontakt mit den Parasiten häufig altersabhängig (NAUS *et al.* 1999). Die durchschnittliche Befallsintensität der Infektionen steigt in der Kindheit an und ist im Erwachsenenalter rückläufig. Dies könnte im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Wirtsimmunität stehen (HOTEZ *et al.* 2008). Die Unterdrückung der Atopie durch Helmintheninfektionen scheint von einer hohen Wurmbürde abzuhängen (VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2004). ARAUJO *et al.* (2000) untersuchten den Zusammenhang zwischen Reaktionen im Hauttest gegen verbreitete Umweltallergene und Schistosomose beim Menschen in einem endemischen Gebiet in Brasilien. Im Vergleich zeigten 24,3 % der nicht infizierten Gruppe (weniger als 24 Eier/g Stuhl) eine positive Reaktion im Hauttest, aber nur 4,8 % der infizierten Gruppe (über 200 Eier/g Stuhl) (ARAUJO *et al.* 2000). Serologische Marker chronischer Infektionen (hohe Gesamt-IgE- oder anti-*A. lumbricoides*-IgG4-Konzentrationen im Serum) sind bei Kindern in endemischen Gebieten ein Schutzfaktor gegen die Entwicklung allergischer Reaktionen im Hauttest (COOPER *et al.* 2003). In Gegenden, in denen hohe Übertragungsraten zu erheblichen und

chronischen Infektionen führen, bewahren Helminthen vor Atopie. Dagegen können sie dort, wo Infektionen nur sporadisch und kurzlebig auftreten, die allergische Reaktivität erhöhen (YAZDANBAKHSI & MATRICARDI 2004). Eine gegenwärtige Infektion mit *A. lumbricoides* hat einen protektiven Effekt gegen atopische Dermatitis, während zurückliegende Infektionen mit *Enterobius vermicularis* und Hakenwürmern Risikofaktoren für die Entwicklung einer allergischen Rhinokonjunktivitis und/oder atopischen Dermatitis darstellen. Offensichtlich spielen also auch die beteiligten Helminthenspezies und die verschiedenen Allergieformen, neben dem Zeitpunkt des Parasitenbefalls, eine Rolle in diesem Wechselspiel (WORDEMANN *et al.* 2008). In einer anderen Studie von DAGOYE *et al.* (2003) wird *Ascaris*- und möglicherweise Hakenwurminfektionen ein Schutz gegen Keuchen und pfeifende Atemgeräusche bei Kindern im Alter zwischen einem und vier Jahren zugesprochen (DAGOYE *et al.* 2003). Vor allem Helminthen mit einer Körperwanderung in ihrem Entwicklungszyklus könnten einen Schutz gegen Allergien bieten (DAGOYE *et al.* 2003, SCRIVENER *et al.* 2001).

2.4.2. Immunmodulation und Antigene

Wurminfektionen und allergische Krankheiten induzieren eine T_H2 -Immunantwort (CARVALHO *et al.* 2006). Sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems, die an der T_H2 -Immunantwort beteiligt sind, können das zentrale T_H2 -Zytokin IL-4 synthetisieren. Dieses vermittelt (direkt oder indirekt) Reaktionen, die seit Jahren mit Helmintheninfektionen in Zusammenhang gebracht werden, wie etwa IgE-Produktion oder Eosinophilie (HOTEZ *et al.* 2008). T_H2 -Zellen synthetisieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. IL-4 und IL-13 sind wichtige Zytokine, die die IgE-Produktion durch B-Zellen stimulieren. Das Zytokin IL-5 wirkt auf die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten ein (Abbildung 1). Es existieren Anhaltspunkte, wonach eine T_H2 -Immunantwort den Wirt gegen Helminthen schützen kann (CARVALHO *et al.* 2006).

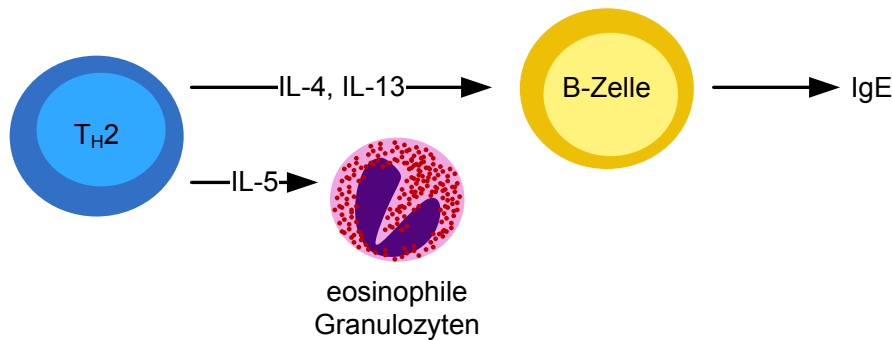


Abbildung 1: Von T_H2-Zellen ausgehende Stimulierung auf B-Zellen und eosinophile Granulozyten durch IL-4, IL-13 und IL-5.

Immunantworten vom Typ 2 können unter anderem dazu führen, dass adulte Parasiten eliminiert werden (FINKELMAN *et al.* 2004) oder das Überleben des Wirtes sichern, wenn die Parasiten nicht beseitigt werden können (HERBERT *et al.* 2004). Eosinophile Granulozyten können *in vitro* mittels antikörperabhängiger zellulärer Zytotoxizität ein larvales Stadium von *S. mansoni* abtöten (PINCUS *et al.* 1981). Während bei Allergien die T_H2-Polarisation des Immunsystems für die pathologischen Effekte verantwortlich ist, ist diese bei Helmintheninfektionen also auch mit einem Schutz verbunden. Allerdings kann die T_H2-Immunantwort auch im Bezug auf Helminthen für pathologische Effekte verantwortlich sein. Bei der Schistosomose des Menschen kann die Formation von Granulomen um abgestorbene Eier zu einer Leberfibrose führen. Von Bedeutung ist, dass im Gegensatz zu Allergien die T_H2-Immunantwort bei Helmintheninfektionen moduliert werden kann. Hierbei dürften dendritische Zellen, T_{reg}-Zellen und IL-10 von großer Wichtigkeit sein. Neben T_H2-Zellen spielen auch T_H1-Zellen eine Rolle für die Abwehrmechanismen des Wirtes. Diese induzieren unter anderem die Bildung von IgG-Antikörpern (CARVALHO *et al.* 2006). Hohe Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum und das Vorhandensein spezifischer IgG4-Antikörper korrelieren positiv mit der Schwere der Helmintheninfektionen (COOPER *et al.* 2003, NAUS *et al.* 1999, PALMER *et al.* 1996). Die Differenzierung von B-Lymphozyten zu IgE produzierenden Zellen erfolgt durch den Einfluss von T_H2-Zellen (CARVALHO *et al.* 2006). Antigene mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften induzieren verschiedene IgG-Subklassen (LAL *et al.* 1991, LANGLEY *et al.* 1994, SHACKELFORD *et al.* 1988). Beispielsweise wird IgG4 hauptsächlich durch Peptid-Antigene und IgG2 vor allem durch Polysaccharid-Antigene induziert. Dagegen kann eine Reaktion mit IgG1 und

IgG3 auf beide Antigenarten erfolgen (LANGLEY *et al.* 1994). Welcher Antikörper-Isotyp gebildet wird, könnte mit dem Alter der Population und der Infektionsintensität zusammenhängen. Die Bildung spezifischer IgG1- und IgG4-Antikörper gegen Wurmantigene, genauso wie die Bildung von IgG4 gegen Eiantigene, sind grundsätzlich mit der Infektionsintensität verknüpft. Die Bildung spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper gegen Eiantigene nimmt mit dem Alter ab (NAUS *et al.* 1999). In Anbetracht solch pro-allergischer Vorgänge wie der T_H2-Polarisation mit verstärkter Produktion von IL-4 und erhöhten Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum scheint die Antwort auf die Frage, warum Helminthen und Allergien negativ assoziiert sind, schwierig (YAZDANBAKHSI & MATRICARDI 2004). Eine These besagt, dass hohe Gesamt-IgE-Konzentrationen die Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen blockieren und somit um die Bindung mit allergen-spezifischem IgE konkurrieren (HAGEL *et al.* 1993). Allerdings müssen auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen (YAZDANBAKHSI & MATRICARDI 2004). IgG4 kann vor IgE-medierte allergischen Reaktionen schützen, indem es mit IgE um die Allergenbindung konkurriert (CARVALHO *et al.* 2006). Bei intestinalen Helmintheninfektionen (*Ascaris*, *Trichuris* und Hakenwürmer) sowie bei einer Infektion mit *S. mansoni* kommt es in bestimmten Phasen der jeweiligen Entwicklungszyklen zu Interaktionen mit der Darmwand. Es bestünde die Möglichkeit, dass parasitäre Antigene über die Darmmukosa dem Immunsystem präsentiert werden und es zu einer tolerogenen Wirkung kommt. Auf der anderen Seite konnten für einige Parasiten immunmodulatorische Moleküle nachgewiesen werden, die die Immunantwort unterdrücken können (YAZDANBAKHSI & MATRICARDI 2004). Daneben spielen bei der Modulation der Immunantwort bei Helmintheninfektionen, wie bereits kurz erwähnt, vermutlich auch dendritische Zellen, T_{reg}-Zellen und IL-10 eine wichtige Rolle (CARVALHO *et al.* 2006). Beispielsweise kann IL-10 sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Immunantwort vermindern (DEL PRETE *et al.* 1993). IL-10 vermag die IgG4-Produktion in die Höhe zu treiben und gleichzeitig die IgE-Produktion zu hemmen (JEANNIN *et al.* 1998). Außerdem kann dieses Zytokin die Freisetzung von Histamin und pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF-α und IL-8) aus aktivierten humanen Mastzellen verhindern (ROYER *et al.* 2001). Dendritische Zellen reagieren auf infektiöse Organismen mittels Rezeptoren, die bestimmte Molekülmuster erkennen, vor allem Toll-like-Rezeptoren (TLR) (BARTON & MEDZHITOV 2003) und C-Typ-Lektine (MCGREAL *et al.* 2005). T_{reg}-Zellen vermindern die Immun-

antwort, indem sie die T_H1 - und/oder die T_H2 -Zellen-Funktionen sowie andere Zellen des Immunsystems supprimieren (CARVALHO *et al.* 2006). Die Abschwächung der Immunantwort könnte durch T_{reg} -Zellen durchgeführt werden, die ebenfalls IL-10 exprimieren (ARAUJO *et al.* 2004).

2.4.2.1. Erfahrungen beim Menschen

Erste Publikationen, wonach Helmintheninfektionen vor Allergien schützen könnten, stammen aus den frühen siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Seitdem sind viele weitere Studien veröffentlicht worden (CARVALHO *et al.* 2006). LYNCH *et al.* (1987) untersuchten bei Personen mit unterschiedlich ausgeprägtem intestinale Helminthenbefall (vor allem *Ascaris*) in Venezuela das Auftreten positiver Hauttestreaktionen auf Allergene. Bei den Patienten mit der größten Wurmbürde war auch die Gesamt-IgE-Konzentration am stärksten erhöht. Während bei diesen Personen viel spezifisches IgE gegen Umweltallergene nachgewiesen wurde, waren die Reaktionen im Hauttest auf diese eher gering (LYNCH *et al.* 1987). Auch Infektionen mit *S. mansoni* können die Reaktionen im Hauttest herabsetzen, wie ARAUJO *et al.* (2000) zeigten. Sie untersuchten infizierte und nicht infizierte Personen in einem für Schistosomose endemischen Gebiet. Mittels ELISA wurde sowohl das Gesamt-IgE als auch spezifisches IgE gegen *S. mansoni* und Umweltallergene im Serum gemessen. Die positiven Hauttestreaktionen in der nicht infizierten Gruppe waren deutlich höher. Daneben fand man in der infizierten Gruppe höhere Gesamt- und *S. mansoni*-spezifische IgE-Konzentrationen (ARAUJO *et al.* 2000). VAN DEN BIGGELAAR *et al.* (2000) konnten in einer Studie in Afrika zeigen, dass IL-10 eine zentrale Rolle bei der Unterdrückung von Atopie bei Kindern spielt. Sie untersuchten den Einfluss chronischer Helmintheninfektionen auf das Vorkommen von Atopie. Hierfür wurden bei 520 Kindern Hauttestreaktionen auf *Dermatophagoides (D.) pteronyssinus* und andere Allergene sowie das Vorkommen von *S. haematobium* überprüft. Infizierte Kinder zeigten weniger positive Reaktionen im Hauttest als nicht infizierte. Außerdem hatten sie signifikant mehr IL-10 und erhöhte Konzentrationen dieses anti-inflammatorischen Zytokins waren negativ mit Reaktionen im Hauttest korreliert (VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2000). SCRIVENER *et al.* (2001) untersuchten in Äthiopien unter anderem die Hypothese, dass das Asthmarisiko durch intestinale Helmintheninfektionen herabgesetzt wird. Sie fanden in Kotproben bei 65 % (371/572) der Studienteilnehmer *T. trichiura*, bei 40 % (228/572) *A. lumbricoides* und bei 24 % (140/572) Hakenwürmer (vornehmlich *N. americanus*). Eine Infektion

mit *S. mansoni* lag nur bei 9 % (53/572) vor. Es wurde keine signifikante Verbindung zwischen spezifischem IgE gegen die Parasiten und pfeifenden Atemgeräuschen und Keuchen nachgewiesen (spezifisches IgE gegen *S. mansoni* wurde aufgrund der geringen Individuenzahl nicht gemessen). Es stellte sich heraus, dass ein Befall mit Hakenwürmern mit einem signifikant reduzierten Risiko, solche Krankheitssymptome zu entwickeln, verbunden ist. Dieser Zusammenhang konnte auch für *A. lumbricoides* nachgewiesen werden, wenn auch in geringerem Ausmaß. Interessanterweise zeigen diese beiden Würmer eine pulmonale Phase in ihrem Entwicklungszyklus. Die Hypothese, dass Helmintheninfektionen vor Atemwegserkrankungen schützen können, wurde bestätigt (SCRIVENER *et al.* 2001). Ganz ähnliche Ergebnisse brachte eine Studie von DAGOYE *et al.* (2003), die ebenfalls in Äthiopien durchgeführt wurde. Auch hier fand man heraus, dass *Ascaris* und möglicherweise Hakenwürmer bei Kindern mit einem Schutz gegen Atemwegserkrankungen verbunden sind (DAGOYE *et al.* 2003). Eine Verbindung zu *Trichuris*-Infektionen konnte in beiden Studien nicht nachgewiesen werden (DAGOYE *et al.* 2003, SCRIVENER *et al.* 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine anthelminthische Therapie bei infizierten Kindern in Venezuela und Gabun mit verstärkten allergischen Reaktionen im Hauttest einhergeht (LYNCH *et al.* 1993, VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2004). Zumindest zum Teil lag das an der Reduktion von *Ascaris*- und/oder *Trichuris*-Infektionen (VAN DEN BIGGELAAR *et al.* 2004). Die Stimulation von Lymphozyten mit Antigen von *Strongyloides stercoralis* bei Patienten mit Strongyloidose resultiert vornehmlich in einer Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und in geringem Ausmaß von IFN- γ . Diese Art der Immunantwort könnte vor Allergien schützen (CARVALHO *et al.* 2006). IL-10 spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunantwort auf eine *S. mansoni*-Infektion und ist außerdem von großer Wichtigkeit hinsichtlich der Kontrolle der Morbidität. Bei der Schistosomose des Menschen verringert IL-10 in der chronischen Phase der Erkrankung die lymphoproliferative Reaktion auf *S. mansoni*-Antigene (CORREA-OLIVEIRA *et al.* 1998). Bei Patienten mit der intestinalen Form der Krankheit moduliert IL-10 außerdem die granulomatöse Reaktion *in vitro* (FALCAO *et al.* 1998). Periphere Blutleukozyten (PBL) von Patienten mit Asthma und gleichzeitiger *S. mansoni*-Infektion aus einem für Helminthen endemischen Gebiet in Brasilien zeigen im Vergleich zu solchen von nicht infizierten Asthmatikern eine geringere Produktion von IL-4 und IL-5 auf Antigenstimulation. Die Zugabe von rekombinan-

tem humanem IL-10 zu Antigen-stimulierten PBL von nicht infizierten Patienten führt zu einer verminderten Produktion von IL-5 (ARAÚJO *et al.* 2004). Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Infektion mit *S. mansoni* eine T_H2-Polarisation des Immunsystems begünstigt, indem es die Reifung dendritischer Zellen unterdrückt und somit zu einer Reduktion des pro-inflammatorischen Phänotyps dendritischer Zellen führt (CARVALHO *et al.* 2006). Bei einer Infektion mit *S. mansoni* bilden vornehmlich CD4⁺CD25⁺ T_{reg}-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems IL-10 (HESSE *et al.* 2004), wodurch sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Immunantwort vermindert werden kann (DEL PRETE *et al.* 1993). Es besteht ein Konsens darüber, dass Helmintheninfektionen Reaktionen im Hauttest gegenüber Umweltallergenen vermindern und das Asthmarisiko reduzieren können. Allerdings existieren nur wenige Studien, die den Einfluss von Helminthen auf den klinischen Verlauf von Asthma untersuchen (CARVALHO *et al.* 2006). MEDEIROS *et al.* (2003) konnten in einer Studie in Brasilien zeigen, dass mit *S. mansoni* infizierte Patienten aus einem für Schistosomose endemischen Gebiet eine mildere Asthmasymptomatik zeigen. Dies wurde über einen Zeitraum von einem Jahr anhand von Fragebögen über asthmatische Symptome, dem Gebrauch von Medikamenten gegen Asthma und klinischen Untersuchungen ermittelt (MEDEIROS *et al.* 2003).

2.4.2.2. Erfahrungen bei anderen Spezies

Die epidemiologischen Studien haben in der Immunologie zu großem Interesse an Tiermodellen für Allergien geführt. Untersuchungen an Tiermodellen unterstützen die Auffassung, dass Helmintheninfektionen allergische Reaktionen unterdrücken können (YAZDANBAKHS & WAHYUNI 2005). BASHIR *et al.* (2002) studierten an Mäusen den Einfluss einer intestinalen Helmintheninfektion auf Nahrungsmittelallergie gegen Erdnüsse. Sie zeigten, dass bei den Tieren sowohl die Produktion von allergen-spezifischem IgE als auch von IL-13 auf Erdnüsse durch eine Infektion mit dem bei Mäusen auch natürlich vorkommenden Wurm *Heligmosomoides (H.) polygyrus* verringert wird. Als die Tiere mit anti-IL-10-Antikörpern behandelt wurden, war die allergen-spezifische T_H2-Immunantwort nicht länger unterdrückt (BASHIR *et al.* 2002). KHAN *et al.* (2002) untersuchten im Mausmodell die Hypothese, dass Helmintheninfektionen einen Einfluss auf die Entwicklung von Morbus Crohn haben. Dafür infizierten sie Mäuse mit *Trichinella spiralis* und induzierten daraufhin eine Kolitis bei den Tieren. Durch die vorausgehende Infektion

verminderten sich der Schweregrad der Kolitis und die T_H1-Zytokinexpression im Gewebe des Kolons. Es kam zu einer T_H2-Immunantwort (KHAN *et al.* 2002). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass *H. polygyrus* bei IL-10-defizienten Mäusen eine bereits bestehende Kolitis unterdrückt (ELLIOTT *et al.* 2004). Für etliche Helmintheninfektionen konnte nachgewiesen werden, dass sie entzündliche Reaktionen der Atemwege verhindern (YAZDANBAKHS & WAHYUNI 2005). WOHLLEBEN *et al.* (2004) fanden heraus, dass eine Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* bei Mäusen, abhängig vom Zeitpunkt der vorhergehenden Infektion, allergen-bedingte eosinophile Entzündungen der Atemwege unterdrückt und dass dies durch IL-10 vermittelt sein könnte (WOHLLEBEN *et al.* 2004). Vergleichbare Ergebnisse erzielten LIMA *et al.* (2002) an einem Mausmodell für Asthma. Sie untersuchten den Einfluss von *A. suum*-Extrakten auf die Entwicklung einer pulmonalen eosinophilen Entzündung. Auch in diesem Modell wurden entzündliche Reaktionen und Überreaktionen der Atemwege unterdrückt (LIMA *et al.* 2002). Infektionen mit *S. mansoni* schützen im Mausmodell sogar vor anaphylaktischen Reaktionen. In diesem Modell bewahrte die IL-10 Produktion durch B-Zellen vor einer fatalen Anaphylaxie (MANGAN *et al.* 2004). Hinweise, wonach T_{reg}-Zellen Allergien beeinflussen können, kommen von Studien, die zeigen, dass T-Zelllinien, die TGF- β (HANSEN *et al.* 2000) oder IL-10 (OH *et al.* 2002) exprimieren, Mäuse vor Entzündung der Atemwege und Überreaktion schützen. TRUJILLO-VARGAS *et al.* (2007) fanden bei Mäusen heraus, dass Helminthen die Entwicklung allergischer Reaktionen unterdrücken können, indem sie Produkte sezernieren, die allergische Antworten modulieren (TRUJILLO-VARGAS *et al.* 2007). FLORES-VILLANUEVA *et al.* (1996) bewiesen für murine Schistosomose, dass IL-10 ein bedeutender Faktor bei der *in vivo* Regulation der Granulomgröße und damit bei der Pathologie dieser Krankheit ist (FLORES-VILLANUEVA *et al.* 1996). Die Immunmodulation von um Eier gebildeten Granulomen in der Leber studierten HURST *et al.* (2006) an mit *S. japonicum* infizierten Schweinen. Sie maßen neun, zwölf und 21 Wochen nach der Infektion die Größe der Granulome sowie die Anzahl von T- und B-Zellen und IgG+ Plasmazellen in den Granulomen. Die Ergebnisse dieser Studie deuteten darauf hin, dass durch Schistosomen-Eier induzierte Granulome in der Leber zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion vom Immunsystem moduliert werden. Die Anzahl der T-Zellen in den Granulomen nahm linear mit deren Verkleinerung ab (HURST *et al.* 2006). GRAHAM *et al.* (2001) wiesen einen immunmodulierenden

Effekt von Helminthen bei Rindern nach. Sie infizierten die Tiere mit *Onchocerca (O.) ochengi*, um im Tiermodell die Immunmodulation bei Langzeitinfektionen mit *O. volvulus*, dem Verursacher der Onchocercose des Menschen, zu untersuchen. Zunächst kam es weder zu einer klassischen T_H2 - noch zu einer T_H1 -Immunantwort. Mit dem Einsetzen einer patenten Infektion kam es dann zu einem starken Abfall der Expression von IL-4 und IFN- γ und graduell von IL-2. Es scheint, als ob die Immunmodulation anfänglich auf einer T_H0 -Immunantwort begründet ist, die sich später zu einer teilweisen T_H2 -Antwort entwickelt (GRAHAM *et al.* 2001).

2.4.3. Helminthenantigene

Helminthen sind große Parasiten, die in ihrem menschlichen und tierischen Wirt lange Zeit überleben können. Die Larven, Adulten und Eier besitzen eine Vielzahl von Antigenen. Anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , werden als Antwort auf die kontinuierliche Stimulation des Immunsystems durch parasitäre Antigene produziert (Abbildung 2). Dadurch soll das Wirtsgewebe vor Schaden bewahrt werden und gleichzeitig könnte dies einen schützenden Effekt bei allergischen Reaktionen haben (CARVALHO *et al.* 2006).

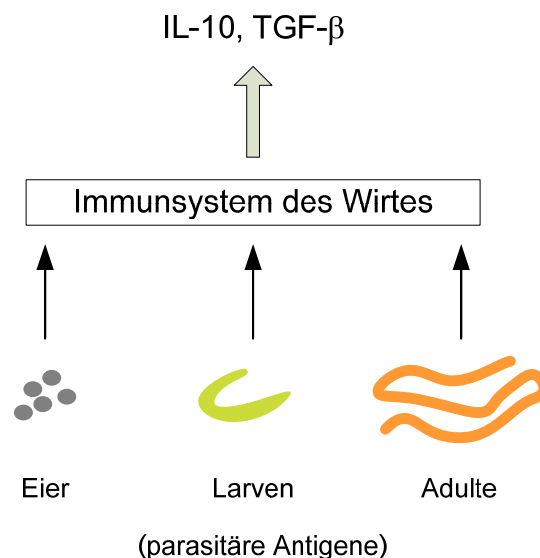


Abbildung 2: Das Immunsystem des Wirtes produziert IL-10 und TGF- β als Antwort auf die Stimulation durch parasitäre Antigene.

Ein befallener Wirt kommt mit einer Vielzahl von Molekülen der Parasiten in Berührung. Diese Moleküle können natürliche Proteine, Nukleinsäuren, Lipide oder Kohlenhydrate sein (HARNETT & HARNETT 2006). Neuere Studien gehen davon

aus, dass diese Produkte der Parasiten auf verschiedene Zweige des Immunsystems (T-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen, Makrophagen) wirken können, indem sie Zytokine und Signaltransduktionswege beeinflussen oder essentielle Enzyme hemmen (HARTMANN & LUCIUS 2003). Zu den am besten charakterisierten immunmodulierenden Proteinen gehören die Cystatine (Cystein Protease Inhibitoren) (HARNETT & HARNETT 2006). Cystatine werden von Nematoden sezerniert und hemmen Proteasen, die an der Antigen-Prozessierung und -Präsentation beteiligt sind. Dies führt zu einer verminderten T-Zellen-Immunantwort. Gleichzeitig beeinflussen Cystatine die Zytokinexpression, vor allem führen sie zu einer erhöhten Produktion von IL-10 (HARTMANN & LUCIUS 2003). LewisX (Le^X)-haltige Lacto-n-fucopentaose III (LNFPIII), ein immunmodulatorisches Oligosaccharid von *S. mansoni*-Eiantigenen, kann *in vitro* die Produktion von IL-10 und die Proliferation von PBL bewirken (VELUPILLAI *et al.* 2000). Schistosomen-spezifisches Lyso-phosphatidylserin aktiviert den TLR 2 auf dendritischen Zellen und verleiht diesen die Fähigkeit, T_{reg}-Zellen zu induzieren, die IL-10 produzieren (VAN DER KLEIJ *et al.* 2002). ES-62, ein Glykoprotein, das von Fadenwürmern sezerniert wird, besitzt eine Fülle immunmodulatorischer Aktivitäten, vor allem anti-inflammatorischer Natur. Zu den immunmodulierenden Aktivitäten von ES-62 gehören unter anderem die Proliferationshemmung von B-Lymphozyten und die Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen (HARNETT *et al.* 2004). Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass doppelsträngige RNA von Schistosomen-Eiern dendritische Zellen über den TLR 3 aktivieren kann (AKSOY *et al.* 2005). ZOUAIN *et al.* (2004) untersuchten den Einfluss von PIII, einem Antigen von adulten *S. mansoni*, auf PBL von Patienten mit chronischer intestinaler Schistosomose. Sie konnten zeigen, dass PIII die zelluläre Proliferation und die granulomatöse Reaktion vermindert. Außerdem führt es zu einer Verringerung von IFN- γ und zu einer erhöhten Produktion von IL-10 (ZOUAIN *et al.* 2004). Es sind etliche *S. mansoni*-Antigene bekannt, die die Produktion von IL-10 induzieren (CARVALHO *et al.* 2006). Die immunmodulatorische Aktivität der Wurmprodukte ist wahrscheinlich vielfach auf eine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems zurückzuführen. Hierzu gehören TLR und C-Typ-Lektine (HARNETT & HARNETT 2006). Es existieren Studien, wonach sich Parasiten und Umweltallergene auch Antigene teilen. Tropomyosin von Invertebraten wird mit der Bildung von IgE-Antikörpern in Zusammenhang gebracht. Es ist ein wichtiges

Allergen, unter anderem von Hausstaubmilben, kommt aber auch bei Helminthen wie beispielsweise *A. lumbricoides* vor. Diese Kreuzreaktivität könnte bei Exposition gegenüber Tropomyosin-haltigen Parasiten auch zu einer erhöhten Allergisierung führen (ARRUDA & SANTOS 2005). Tropomyosin von Invertebraten ist im Stande, eine starke T-Zellen-Immunantwort auszulösen. Daneben ist es aber eines der wenigen Antigene von Nematoden, für das die Entwicklung einer signifikanten protektiven Immunität gegen die Parasiten beschrieben ist (SEREDA *et al.* 2008).

2.4.4. Helminthen als Therapie bei Allergien und immunbedingten Krankheiten

Asthma hat weltweit epidemische Ausmaße erreicht. Mittlerweile wurden Parasiten als mögliche alternative Therapie bei Asthma und anderen immunbedingten Krankheiten eingeführt. In aktuellen Versuchen werden beispielsweise *T. suis* (Peitschenwurm des Schweines) und *N. americanus* (Hakenwurm des Menschen) bei IBD (Inflammatory Bowel Disease) und Asthma eingesetzt (FALCONE & PRITCHARD 2005). SUMMERS *et al.* (2003) untersuchten, wie gefahrlos und wirksam die Verabreichung von *T. suis*-Eiern bei der Behandlung aktiver IBD ist. Dafür verabreichten sie vier Patienten mit Morbus Crohn und drei Patienten mit ulzerativer Kolitis initial eine einmalige orale Dosis von 2500 *T. suis*-Eiern, ohne an der Basistherapie etwas zu ändern, und untersuchten sie daraufhin alle zwei Wochen über einen Zeitraum von zwölf Wochen. Beurteilungsparameter waren hierbei klinische Untersuchungen, Labordiagnostik und Indizes für die jeweilige Krankheit (Crohn's Disease Activity Index, Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI), Inflammatory Bowel Disease Quality of Life Index (IBDQ)). Um die Sicherheit und Effektivität wiederholter Dosen bewerten zu können, bekamen jeweils zwei Patienten mit Morbus Crohn und ulzerativer Kolitis im Anschluss an die Initialphase alle drei Wochen 2500 *Trichuris*-Eier als Erhaltungstherapie. Alle Patienten zeigten in der Beobachtungsperiode eine klinische Besserung, ohne Nebenwirkungen oder Veränderungen in den Laborwerten. Drei der vier Patienten mit Morbus Crohn und alle Patienten mit ulzerativer Kolitis gingen innerhalb von zwölf Wochen in Remission. Allerdings war die Wirkung der initialen Dosis nur temporär. Bei den Patienten, die alle drei Wochen eine Erhaltungstherapie bekommen hatten, war die Verbesserung der klinischen Symptome nachhaltig (SUMMERS *et al.* 2003). Laufende Versuche beschäftigen sich mit der Wirkung einer Infektion mit *N. americanus* auf Asthma (FALCONE & PRITCHARD 2005).

2.5. Immunpathologie der atopischen Dermatitis

An der Pathophysiologie der atopischen Dermatitis sind vielfältige Vorgänge beteiligt. Im Laufe der Krankheit werden komplexe immunologische und inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt (NOVAK *et al.* 2003). Vor allem allergen-spezifische T-Helferzellen spielen eine herausragende Rolle in der Pathogenese von Allergien. Sie aktivieren eine komplexe Reaktion des Immunsystems, infolge deren es zur Freisetzung potenter Mediatoren kommt und die Einwanderung von Entzündungszellen gefördert wird (NAUTA *et al.* 2008).

2.5.1. Pathogenese der atopischen Dermatitis

Atopie ist definiert als genetisch prädisponierte Neigung, eine IgE-mediierte Allergie gegen Umweltallergene zu entwickeln (OLIVRY *et al.* 2001a). Humane atopische Dermatitis tritt familiär gehäuft auf. Kinder betroffener Eltern tragen ein mehrfach erhöhtes Risiko, die Krankheit zu entwickeln (NOVAK *et al.* 2003). Auch bei Hunden spricht die Häufung der Krankheit intrafamiliär und bei bestimmten Rassen für eine bedeutende Rolle genetischer Faktoren (MARSELLA & OLIVRY 2003, SOUSA & MARSELLA 2001). Obwohl eine genetische Prädisposition für die Entwicklung atopischer Dermatitis offensichtlich ist, geht man in der Humanmedizin davon aus, dass der jüngste Anstieg der Prävalenz durch ein komplexes Zusammenspiel mit Umweltfaktoren bedingt ist (ABRAMOVITS 2005). Etliche Einflüsse, wie etwa Exposition gegenüber Endotoxinen oder Haustieren früh im Leben, bakterielle und virale Infektionen in der Kindheit, der Gebrauch von Antibiotika, Lebensumstände und Lebensweise sowie körperliche Aktivität und Ernährung könnten gemeinsam eine Rolle bei der Entwicklung allergischer Krankheiten spielen (ARRUDA & SANTOS 2005). Die „Hygiene-Hypothese“ ging davon aus, dass es durch einen Rückgang von Infektionen zu einer schwächeren T_H1 - und gleichzeitig zu einer verstärkten T_H2 -Immunantwort kommt (YAZDANBAKHSI & MATRICARDI 2004). Aufgrund neuerer Beobachtungen ist eine andere Interpretation der „Hygiene-Hypothese“ entstanden, die durch eine reduzierte Aktivität von T_{reg} -Zellen erklärt wird. T_{reg} -Zellen regulieren sowohl die T_H1 - als auch die T_H2 -Immunantwort. Eine hohe Pathogenbürde ist entscheidend für die Entwicklung von T_{reg} -Zellen und damit für eine ausgeglichene Entwicklung des Immunsystems (NAUTA *et al.* 2008).

Die atopische Dermatitis ist sehr häufig mit IgE-Antikörpern gegen Umweltallergene verbunden (OLIVRY *et al.* 2001a). Die meisten humanen Patienten mit atopischer Dermatitis zeigen erhöhte Gesamt-IgE-Konzentrationen im Serum, viele davon auch allergen-spezifisches IgE gegen Umwelt- und/oder Nahrungsmittelantigene. Die Bedeutung von allergen-spezifischem IgE bei der Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis ist weniger eindeutig. Die meisten Hunde mit atopischer Dermatitis besitzen allergen-spezifisches IgE, allerdings steht das Auftreten von Krankheitssymptomen damit nicht unbedingt in engem Zusammenhang (MARSELLA & OLIVRY 2003). Dies wird besonders dadurch deutlich, dass viele gesunde Hunde positive Reaktionen auf Hausstaubmilben im Intrakutantest zeigen (LIAN & HALLIWELL 1998). IgE findet sich auf der Oberfläche von epidermalen und dermalen dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen. Dies spricht für eine Rolle von IgE bei der Allergenbindung und/oder Antigen-Präsentation. Die Anzahl dendritischer Zellen, die IgE-Moleküle auf ihrer Oberfläche gebunden haben, korreliert mit den vorhandenen IgE-Spiegeln (OLIVRY *et al.* 1996). Die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen in Plattenepithelien sind Langerhans-Zellen. Ihre Hauptaufgabe ist die Aktivierung allergen-spezifischer T-Lymphozyten (HILL & OLIVRY 2001). Eine Beteiligung von IgG an der Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis konnte bisher nicht belegt werden (HALLIWELL & DEBOER 2001).

Neben dendritischen Antigen-präsentierenden Zellen besteht das typische Hautinfiltrat bei caniner atopischer Dermatitis aus Mastzellen, T-Helferzellen, einer geringen Anzahl von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten und vereinzelt B-Lymphozyten (OLIVRY *et al.* 1997). In der Humanmedizin hat man sich umfangreich mit der Rolle von Mastzellen bei allergischen Krankheiten beschäftigt. Die Aktivierung von Mastzellen spielt eine bedeutende Rolle bei der Auslösung akuter allergischer Reaktionen, wie etwa der Gewebeschwellung und Ödembildung (NAUTA *et al.* 2008). Durch die Freisetzung chemotaktischer und pro-inflammatorischer Mediatoren können Mastzellen auch einen Effekt auf allergische Spätreaktionen haben (METZ *et al.* 2007, VLIAGOFTIS & BEFUS 2005). Sie besitzen eine Reihe vielfältiger Oberflächenrezeptoren, durch die ein weites Spektrum zellulärer Reaktionen ausgelöst werden kann. Einige Rezeptoren sind aktivierend, andere inhibitorisch. Der am besten charakterisierte aktivierende Rezeptor ist FcεRI. Dieser ist an der IgE-abhängigen Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp beteiligt.

Aktivierte Mastzellen setzen eine Fülle von Entzündungsmediatoren frei, darunter biogene Amine, Arachidonsäuremetaboliten, Proteinasen, Zytokine und Chemokine (VLIAGOFTIS & BEFUS 2005). Für gewöhnlich wird dies durch die Interaktion zwischen Allergenen und allergen-spezifischem IgE, das auf der Oberfläche von Mastzellen durch den hoch affinen FcεRI-Rezeptor gebunden ist, ausgelöst (HILL & OLIVRY 2001). Isolierte Mastzellen aus der Haut atopischer Hunde zeigen gegenüber solchen gesunder Hunde eine verstärkte Mediatorenfreisetzung (DEMORA *et al.* 1996).

CD4+ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) sind dafür ausgerüstet, auf exogene Antigene zu reagieren. Diese werden ihnen nach der Antigenbearbeitung durch dendritische Zellen über den T-Zellen-Rezeptor präsentiert. CD4+ T-Zellen stimulieren B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion und stimmen die Effekte anderer inflammatorischer Zellen ab. Die T-Helferzellen können noch weiter in T_H1- und T_H2-Zellen unterschieden werden, die sich durch eine unterschiedliche Zytokinproduktion auszeichnen (HILL & OLIVRY 2001).

B-Lymphozyten bilden antigen-spezifische Antikörper (HILL & OLIVRY 2001). Dennoch gehören sie nicht zum Hauptbestandteil des entzündlichen zellulären Infiltrats bei Hunden mit atopischer Dermatitis (OLIVRY *et al.* 1997).

Eosinophile Granulozyten werden durch spezifische chemotaktische Faktoren wie etwa Histamin in das Entzündungsgebiet gelockt. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, unter anderem Fc-Rezeptoren für IgG und niedrig affine IgE-Rezeptoren (MCEWEN 1992). Eosinophile Granulozyten werden im histologischen Schnitt von atopischen Läsionen kaum gesehen und scheinen daher bei der caninen atopischen Dermatitis eine untergeordnete Rolle zu spielen (OLIVRY *et al.* 1997). Allerdings beinhalten eosinophile Granula höchst irritative und destruktive Substanzen. Daher können schon wenige eosinophile Granulozyten großen Schaden anrichten (HILL & OLIVRY 2001).

Neutrophile Granulozyten repräsentieren beim Hund mit atopischer Dermatitis nur einen geringen Anteil des entzündlichen Infiltrats (OLIVRY *et al.* 1997). Ausgenommen hiervon sind bakteriellen Sekundärinfektionen, bei denen man ein ausgedehntes Infiltrat von neutrophilen Granulozyten erwarten kann (HILL & OLIVRY 2001).

Bei der humanen atopischen Dermatitis trägt auch eine defekte Lipidbarriere zur Pathogenese der Krankheit bei. Die Haut wird trocken und es kommt zu einem erhöhten Flüssigkeitsverlust über die Haut. Auch beim Hund gibt es Hinweise für eine solche gestörte Barrierefunktion. Die Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis zeigt eine veränderte Struktur der Lipidschicht, beispielsweise ist deren Dicke im Vergleich zur Haut gesunder Hunde viel geringer (INMAN *et al.* 2001).

2.5.2. Akute Läsionen

Allergen-spezifische CD4⁺ T-Zellen, die in den Frühstadien an allergischen Reaktionen beteiligt sind, zeigen ein eindeutiges Zytokinprofil. Dieses ist charakterisiert durch eine verstärkte Produktion von IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (T_H2-Zytokine) (ROMAGNANI 2000, UMETSU & DEKRUYFF 1997). Die Anwesenheit hoher Konzentrationen dieser T_H2-Zytokine trägt zur klinischen Symptomatik von Allergien bei (NAUTA *et al.* 2008). Zytokine und Chemokine, die von T_H2-Zellen produziert werden, und solche, die von anderen Zellen nach Stimulation durch T_H2-Zytokine oder als Reaktion auf T_H2-bedingte Gewebeschädigung gebildet werden, sind für die meisten pathophysiologischen Gesichtspunkte von Allergien verantwortlich. T_H2-Zytokine induzieren die Differenzierung, die Aktivierung und das Überleben *in situ* von eosinophilen Granulozyten (durch IL-5), fördern die Produktion großer Mengen von Antikörpern einschließlich IgE durch B-Lymphozyten (durch IL-4 oder IL-13), ebenso wie die Entwicklung von Mastzellen und basophilen Granulozyten (durch IL-4, IL-9 und IL-10). IL-4, IL-10 und IL-13 hemmen außerdem mehrere Funktionen von Makrophagen oder auch die Bildung von T_H1-Zellen (Abbildung 3). Das Zytokin mit zentraler Bedeutung ist IL-4. Es ist unter anderem verantwortlich für das IgE-Isotypen-Switching (ROMAGNANI 2000).

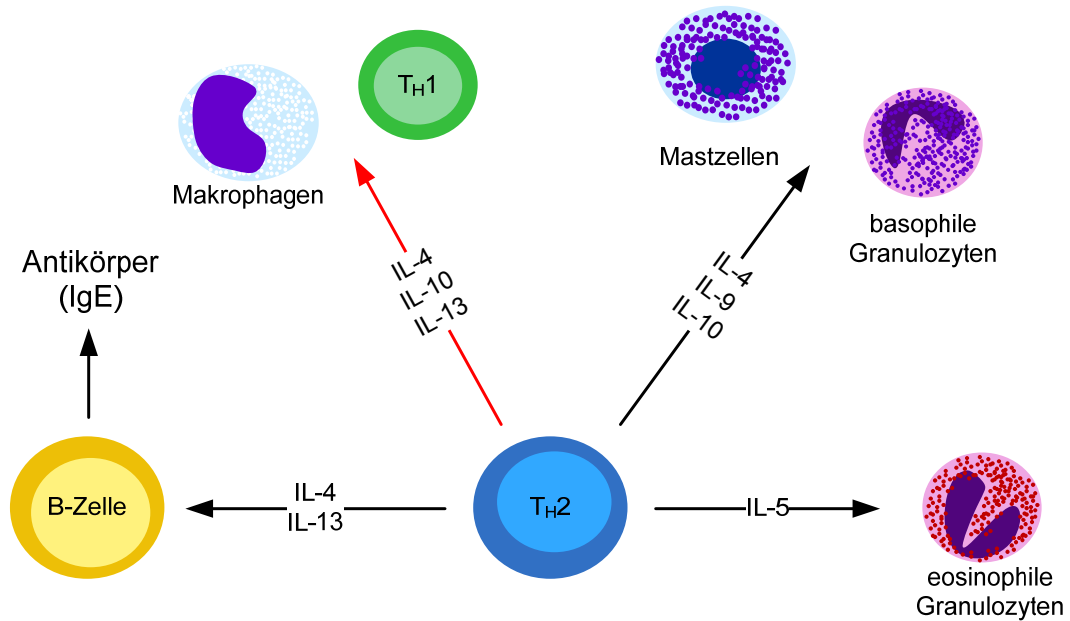


Abbildung 3: T_H2-Zytokine stimulieren die Antikörperproduktion durch B-Zellen, wirken hemmend auf Makrophagen und die Bildung von T_H1-Zellen und fördern die Entwicklung von basophilen Granulozyten, Mastzellen sowie eosinophilen Granulozyten.

Für die Induktion der IgE-Synthese bei humanen B-Zellen werden zwei Signale benötigt. Das erste Signal kommt von den Zytokinen IL-4 oder IL-13. Diese werden von T-Zellen, aber auch von Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet. Das zweite Signal für die Einleitung der IgE-Synthese erfordert einen Zellkontakt zwischen T- und B-Zellen. Die Bindung des B-Zellen-Antigens CD40 durch den CD40-Liganden, der von T-Zellen exprimiert wird, führt zu einem anschließenden Isotypen-Switching während der Antikörpersynthese in B-Zellen. Die IgE-abhängige Stimulation von Gewebemastzellen und basophilen Granulozyten begründet eines der hauptsächlichen Effektorsysteme der Immunantwort (WORM & HENZ 1997). Wenn Mastzellen durch ihren IgE-Rezeptor aktiviert werden, kommt es nach der Freisetzung verschiedener Mediatoren zur Sekretion vieler Zytokine, darunter IL-4 und IL-13 (BURD *et al.* 1995). Auch bei Hunden mit atopischer Dermatitis sprechen einige Studien über die Zytokinproduktion in der Haut für eine T_H2-Polarisation des Immunsystems (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b, OLIVRY *et al.* 1999).

2.5.3. Chronische Läsionen

Bei humanen atopischen Patienten konnte gezeigt werden, dass das Zytokinprofil mit dem Fortschreiten der Krankheit von einer T_H2 -Polarisation zu einer T_H1 -Polarisation wechselt (LEUNG 2000, LEUNG & BIEBER 2003). In chronischen Hautläsionen atopischer Dermatitis findet man im Gegensatz zum akuten Stadium wesentlich weniger Zellen, die IL-4 mRNA und IL-13 mRNA exprimieren, dafür aber vermehrt Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-12 mRNA und IFN- γ mRNA exprimierende Zellen. Hinzu kommt eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Makrophagen. Die gesteigerte Expression von IL-12 in der Haut von Patienten mit chronischer atopischer Dermatitis ist von besonderer Bedeutung, da dieses Zytokin eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer T_H1 -Immunantwort spielt. IL-12 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen oder eosinophilen Granulozyten gebildet und induziert T_H1 -Zellen (Abbildung 4) (LEUNG 2000).

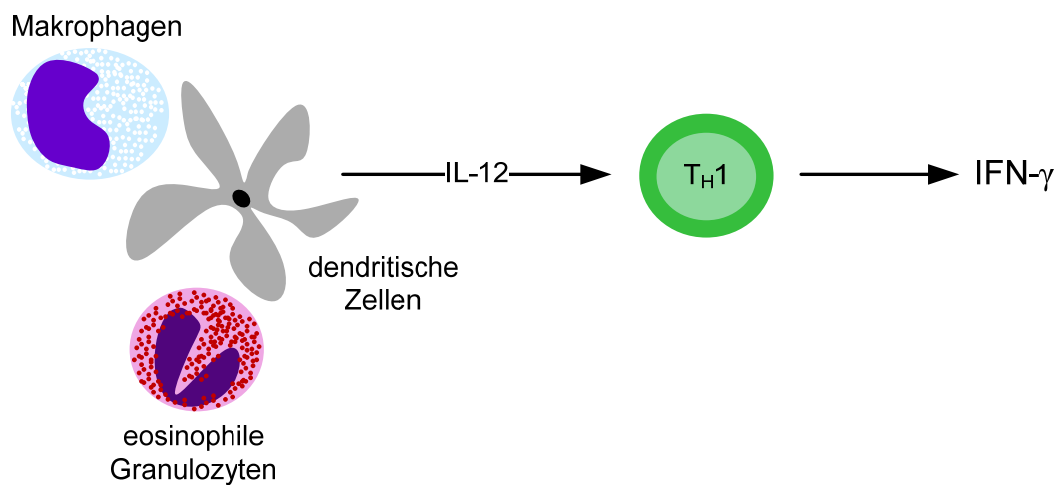


Abbildung 4: In chronischen Läsionen bilden Makrophagen, dendritische Zellen und eosinophile Granulozyten IL-12. Dieses induziert T_H1 -Zellen, die vor allem IFN- γ produzieren.

Die erhöhte Expression von IL-12 mag damit zusammenhängen, dass IL-4 die Expression von IL-12 durch eosinophile Granulozyten hervorrufen kann (GREWE *et al.* 1998b). Chronische atopische Dermatitis ist mit einer verlängerten Überlebenszeit von eosinophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in der Haut verbunden (LEUNG 2000). Die biphasische T-Zellen-Aktivierung konnte auch in Studien über

Patch-Tests für Kontaktallergien gezeigt werden. 24 Stunden nach der Applikation des Allergens auf die Haut kommt es zu einer erhöhten Expression von IL-4. Im Gegensatz dazu kann IFN- γ zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden. Allerdings kommt es zu einer stark erhöhten Expression von IFN- γ nach 48 bis 72 Stunden. IFN- γ , aber nicht IL-4, wird mit der Schwere der klinischen Symptomatik bei atopischer Dermatitis in Verbindung gebracht (GREWE *et al.* 1998a). Dieses Zytokin ist verantwortlich für eine verminderte T_H2-Zellen-Aktivität, beispielsweise unterdrückt es die polyklonale Produktion von IgE-Antikörpern (COFFMAN & CARTY 1986). Allergen-spezifische T-Zellen aus der Haut von Patienten mit chronischen Veränderungen produzieren in der überwiegenden Mehrheit IFN- γ . Das zeigt, dass die Expression dieses Zytokins große Bedeutung für die Pathogenese in der chronischen Phase atopischer Dermatitis hat (WERFEL *et al.* 1996). In lässionaler Haut atopischer Hunde findet man im Vergleich zu nicht-lässionaler Haut hohe Spiegel der T_H1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b).

2.5.4. Veränderungen mit erfolgreicher Therapie

Die Induktion allergen-spezifischer Anergie bei peripheren T-Zellen, die sich durch eine verminderte Proliferation und Zytokinproduktion gegen bedeutende Allergene auszeichnet, ist ein Schlüssel zum Erfolg spezifischer Immuntherapie. Dieser Zustand entsteht durch erhöhte Produktion von IL-10. Dabei wird IL-10 anfangs von aktivierten CD4⁺CD25⁺ allergen-spezifischen T-Zellen und nachfolgend von B-Zellen und Monozyten gebildet. Neben der Verursachung einer spezifischen Anergie peripherer T-Zellen reguliert eine erhöhte Produktion von IL-10 auch noch die Bildung von spezifischem IgE und IgG4 (AKDIS *et al.* 1998). IL-10 kann sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Immunantwort hemmen (DEL PRETE *et al.* 1993). Beim Menschen induziert eine erfolgreiche Immuntherapie mit hohen Dosen des Hausstaubmilbenantigens *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) 1 die Sekretion von IL-10 und TGF- β durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (JUTEL *et al.* 2003). CD4⁺ T_{reg}-Zellen, die für die Unterdrückung der Immunantwort verantwortlich sind, sind entscheidend für die Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz (GROUX *et al.* 1997, READ & POWRIE 2001, SHEVACH 2000). Zu den T_{reg}-Zellen gehören zum einen T_{reg}1-Zellen, die große Mengen IL-10 produzieren und durch chronische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von IL-10 entstehen. Daneben gibt es T_H3-Zellen, die nach oraler Antigengabe induziert werden und vorwiegend TGF- β

sezernieren (JUTEL *et al.* 2003). Die gesteigerte Bildung von IL-10 und TGF- β durch T_{reg}-Zellen kann wirksam die Produktion von IgE unterdrücken und gleichzeitig die Erzeugung der nicht-entzündlichen Antikörper-Isotypen IgG4 und IgA steigern (AKDIS *et al.* 2005). IgG4-Antikörpertiter, die mit einer Besserung der atopischen Symptomatik verbunden sind, findet man in erhöhten Mengen im Laufe einer allergen-spezifischen Immuntherapie (AKDIS *et al.* 2005, LU *et al.* 1998). T_{reg}-Zellen unterdrücken direkt oder indirekt die Effektorzellen allergischer Entzündung, wie etwa Mastzellen sowie basophile und eosinophile Granulozyten (AKDIS *et al.* 2005). Die Bildung allergen-spezifischer T_{reg}-Zellen und die gesteigerte Produktion der hemmenden Zytokine IL-10 und TGF- β sind somit wesentliche Ereignisse bei einer allergen-spezifischen Immuntherapie (Abbildung 5) (AKDIS *et al.* 1998, JUTEL *et al.* 2003, KEPPEL *et al.* 2008).

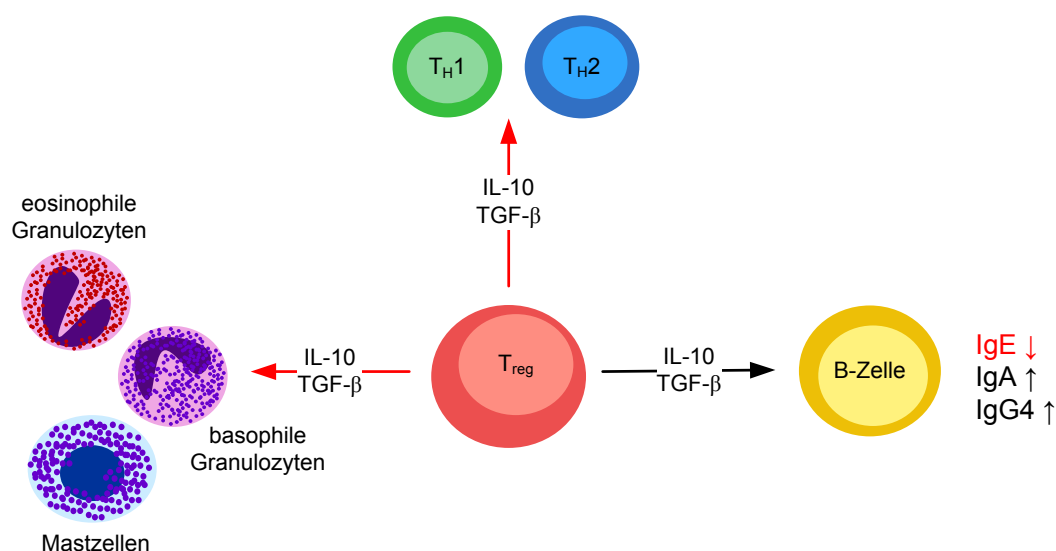


Abbildung 5: Die Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) und die Bildung von IL-10 und TGF- β sind bedeutend für den Erfolg einer allergen-spezifischen Immuntherapie. Dadurch wird sowohl die Immunantwort (T_{H1}, T_{H2}), als auch die Funktion von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen gehemmt. Außerdem wird dadurch die Antikörperproduktion durch B-Zellen reguliert (angelehnt an AKDIS *et al.* 2005).

2.5.5. Nachweis von Zytokinen

Etliche Studien bei Menschen mit Atopie konzentrieren sich auf das Muster der Zytokinsekretion allergen-spezifischer T-Zellen (TAGLINGER *et al.* 2008). Die Real-time Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (quantitative PCR, qPCR) wurde für die quantitative Bestimmung der Zytokinexpression in menschlichen Geweben benutzt (NOMURA *et al.* 2003). In Studien bei Hunden mit atopischer Dermatitis wurden für die Detektion von Zytokin-mRNA in läsionaler Haut nicht-quantitative (OLIVRY *et al.* 1999) und semi-quantitative Methoden (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b) verwendet. Die qPCR bedient sich fluoreszierender Reportermoleküle, um die Produktion von Amplifikaten während jedes Zyklus der PCR-Reaktion zu überwachen (BUSTIN *et al.* 2005). Sie ist die Methode der Wahl für den Nachweis von mRNA (BUSTIN 2000). Dennoch kann der Nachweis mittels qPCR aufgrund verschiedener Punkte, beispielsweise zu geringer Mengen an cDNA-Matrize, der Anwesenheit von Inhibitoren der Polymerase-Aktivität bei der Reversen Transkription (RT) und PCR oder aufgrund der angewendeten Normalisierungsmethode, schwierig sein. Isoliert man RNA aus komplexen Geweben, so liefern die Ergebnisse einer qPCR immer durchschnittliche Daten zahlreicher Zellen unterschiedlicher Zelllinien und zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Aufgrund dieser Variabilität erbringt die qPCR zwar qualitative Ergebnisse, die quantitativen Daten müssen allerdings manchmal kritisch interpretiert werden (BUSTIN *et al.* 2005). Außerdem ist das Vorhandensein von mRNA nicht unbedingt gleichzusetzen mit der Proteinsynthese (KAY *et al.* 1991) und somit der tatsächlichen Anwesenheit des Zytokins.

2.6. Histopathologie der atopischen Dermatitis

2.6.1. Beim Menschen

Die histologischen Merkmale atopischer Dermatitis hängen von der Chronizität der Hautläsionen ab (LEUNG 1995, LEUNG *et al.* 1983). Unbetroffene oder klinisch unauffällige Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis erscheint histologisch nicht normal. Es zeigt sich eine milde Hyperkeratose, epidermale Hyperplasie und ein spärliches zelluläres Infiltrat in der Dermis, bestehend hauptsächlich aus Lymphozyten (LEUNG 1995).

Akute Läsionen sind gekennzeichnet durch ein ausgeprägtes interzelluläres Ödem (Spongiose) der Epidermis und ein intrazelluläres Ödem, was sich in einem aufgeblasenen Aussehen der Keratinozyten äußert (LEUNG 1995). Häufig kann man ein spärliches epidermales Infiltrat, das hauptsächlich aus T-Lymphozyten besteht, beobachten (LEUNG 2000). In der Dermis findet sich ein ausgeprägtes perivenöses Infiltrat mit Entzündungszellen, vornehmlich Lymphozyten und gelegentlich Monozyten/Makrophagen. Eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten werden in akuten Läsionen selten gefunden. Mastzellen sieht man in normaler Anzahl in verschiedenartigen Degranulationsstadien (LEUNG 1995).

Bei chronischen lichenifizierten Läsionen ist die Epidermis hyperplastisch und zeigt markante Hyperkeratose und minimale Spongiose. Es findet sich eine erhöhte Anzahl von Langerhans-Zellen in der Epidermis. Makrophagen dominieren das mononukleäre Zellinfiltrat in der Dermis. Mastzellen treten vermehrt auf (LEUNG 1995). Außerdem werden in chronischen Läsionen verstärkt eosinophile Granulozyten beobachtet (LEUNG 2000). Von ihnen denkt man, dass sie zu Entzündung und Gewebeschädigung durch Sekretion von reaktiven Sauerstoffprodukten und pro-inflammatorischen Zytokinen beitragen können (LEUNG & BIEBER 2003). Endotheliale Zellen des superfiziellen Venenplexus und tief liegender Venen sind hypertrophiert mit vergrößerten Nuklei und markanten Nukleoli. Ein prominenter Befund in den lichenifizierten Plaques ist eine Fibrose der oberen Epidermis (LEUNG 1995).

2.6.2. Beim Hund

Das entzündliche Infiltrat bei caniner atopischer Dermatitis ist vergleichbar mit dem der humanen Krankheit. Man findet überwiegend Mastzellen, weiterhin dendritische Zellen und T-Lymphozyten sowie gelegentlich intakte und degranulierte eosinophile Granulozyten (OLIVRY *et al.* 1997). Neuere Studien haben erbracht, dass Hautläsionen bei caniner atopischer Dermatitis ein entzündliches Muster zeigen, das als chronische, hyperplastische und spongiotische, perivaskuläre Dermatitis charakterisiert wird (OLIVRY & HILL 2001).

OLIVRY *et al.* (1997) sahen in Schnitten klinisch normal erscheinender Haut atopischer Hunde, dass die Epidermis geringgradig, diffus und gleichmäßig hyperplastisch war. In der Epidermis waren keine neutrophilen und eosinophilen Granulozyten oder Mastzellen zu finden. Epidermale Langerhans-Zellen schienen im Vergleich zur Haut gesunder Hunde in erhöhter Anzahl vorzukommen. Mikroaggregate

von Langerhans-Zellen in der Haut wurden nicht gefunden. In sechs von 14 histologischen Schnitten wurden epitheliotrophe T-Lymphozyten in geringer Anzahl gesehen (OLIVRY *et al.* 1997).

In Schnitten läsionaler Haut atopischer Hunde erschien die Epidermis mäßig bis ausgesprochen hyperplastisch mit einem diffusen und irregulären Muster. Eine geringe bis mittlere Anzahl neutrophiler Granulozyten wurde in der Epidermis in sechs von 14 Schnitten bemerkt. Intakte eosinophile Granulozyten, gelegentlich von freien eosinophilen Granula umgeben, waren in vier von 14 Schnitten zu sehen. In diesen Fällen formierten sich die eosinophilen Granulozyten zu fokalen subkornealen Mikroabszessen. Epidermale Mastzellen wurden nicht gefunden. Verglichen mit der Haut gesunder Hunde und nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde fand sich eine erhöhte Anzahl von Langerhans-Zellen in der Epidermis. Einige T-Lymphozyten konnte man in allen Schnitten läsionaler Haut in der Epidermis sehen (OLIVRY *et al.* 1997).

Bei Betrachtung der Dermis von Hunden mit atopischer Dermatitis fanden sich in klinisch unauffällig erscheinender Haut Leukozyten, hauptsächlich mit perivaskulärer Verteilung. Mononukleäre Zellen in der Dermis waren zusammengesetzt aus dendritischen Zellen und T-Lymphozyten (OLIVRY *et al.* 1997).

In läsionaler Haut atopischer Hunde waren die Leukozyten in der Dermis in einem superfiziellen, perivaskulären bis diffusen Muster angeordnet. Die dermale Zellzahl war gegenüber der in der Haut gesunder Hunde und der in nicht-läsionaler Haut signifikant erhöht. Neutrophile Granulozyten fanden sich immer in der Dermis läsionaler Haut, wenngleich in geringer Zahl. Eosinophile Granulozyten fanden sich in fast allen Schnitten, ihre Zahl variierte von Fall zu Fall. Das prozentuale Vorkommen eosinophiler Granulozyten in der Dermis war in läsionaler Haut signifikant höher als in nicht-läsionaler Haut oder der Haut gesunder Hunde. Der prozentuale Anteil von Mastzellen in der Dermis unterschied sich dagegen in den Schnitten unterschiedlicher Hautläsionen nicht (OLIVRY *et al.* 1997).

Zusammenfassend besteht das epidermale Infiltrat läsionaler Haut atopischer Hunde aus Langerhans-Zellen, T-Lymphozyten, gelegentlich intakten und degranulierten eosinophilen Granulozyten und selten neutrophilen Granulozyten. In ähnlicher Weise besteht das zelluläre entzündliche Infiltrat in der Dermis läsionaler Haut aus Mastzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und einer geringen Anzahl neutrophiler und eosinophiler Granulozyten. Die Anwesenheit von eosinophilen Granulozyten in

der Haut, wie sie in dieser Studie beobachtet wurde, könnte für die Pathogenese von Hautläsionen bei caniner atopischer Dermatitis wichtig sein (OLIVRY *et al.* 1997).

III. Material und Methoden

3.1. Material

Sofern im Folgenden keine anderen Angaben gemacht werden, stammen die Herstellerfirmen der Materialien aus Deutschland.

3.1.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Agilent RNA 6000 Eukaryonten Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Avidin-Biotin-Komplex	Vectastain: PK-6100, Linaris
	Biologische Produkte GmbH, Wertheim
Biebrich-Scharlach	Chroma Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Stuttgart, CI 26905
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chloroform	AppliChem GmbH, Darmstadt
Citrat Monohydrat	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Nr. 3958.2
DAB (Substrat Chromogenreaktion)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Nr. 4170
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Nr. 1.019.60
dNTP Mix 20 mM	Fermentas, Ontario, Kanada
EDTA Di-Natrium-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt, Nr. 1.03943
Essigsäure 100 %	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 100 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 96 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 95 % (Histologie)	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethanol 95 % (Klinik)	CLN GmbH, Niederhummel
Ethanol 70 %	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

Eukitt (Roti [®] -Histokitt II, Einschlussmittel)	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formaldehydlösung 10 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
GeneRuler [™] 50bp DNA Ladder	Fermentas, Ontario, Kanada
Giemsa-Stammlösung	Merck, Darmstadt, Nr. 1.0924.0500
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Nr. 1.04302.0100
Hot FIREPol [®] Polymerase 5 U/μl (PCR)	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A3620
Lithiumkarbonat	Merck, Darmstadt, Nr. 1.04543
6 x Loading Dye Solution (Ladepuffer)	Fermentas, Ontario, Kanada
2 x Loading Dye Solution (Ladepuffer für RNA Elektrophorese)	Fermentas, Ontario, Kanada
Mayers Hämalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A0884
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 25 mM	Solis Biodyne, Tartu, Estland
Natriumacetat 3 M	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	neoLab [®] Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Natriumhydroxid (NaOH) 2 n	AppliChem GmbH, Darmstadt, Nr. A2518
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt
Paraffin	SAV LP, Flintsbach am Inn
peqGOLD TriFast [™]	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen bei 4 °C aufbewahrt
peqGOLD Universal Agarose	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
10 x Puffer B	Solis Biodyne, Tartu, Estland
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden bei -20 °C gelagert

QuantiTect [®] SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNaseZap [®] Flüssigkeit	bei -20 °C in Aliquots à 2 ml gelagert
Salzsäure, konzentriert (37 %)	Ambion Inc., Austin, USA
	neoLab [®] Labor Spezialprodukte,
	Heidelberg
SDS granuliert, reinst	AppliChem GmbH, Darmstadt
Silikonlösung	Serva, Heidelberg
Target-Retrieval-Lösung (pH 9,9), gebrauchsfertig	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Nr. S3308
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Vet-Sept [®] Spray	A. Albrecht GmbH, Aulendorf
Wasser für die Molekularbiologie (RNase-frei)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 % (Labor)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 % (Histologie)	neoLab [®] Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Xylocain [®] 2 % (Lidocainhydrochlorid)	AstraZeneca GmbH, Wedel
Xylol (Isomerengemisch)	SAV LP, Flintsbach am Inn

3.1.2. Lösungen

Agarose 1 %	0,3 g peqGOLD Universal Agarose 30 ml 0,5 x TBE Puffer vor Gebrauch angesetzt
Agarose 2 %	0,9 g peqGOLD Universal Agarose 45 ml 0,5 x TBE Puffer vor Gebrauch angesetzt
Alkohollösung, sauer (1 %)	2 ml konzentrierte Salzsäure (37 %) 200 ml 70%iges Ethanol
Biebrich-Scharlach-Lösung 1 %	0,2 g Biebrich-Scharlach 20 ml Aqua dest.
Citratpuffer (1mM, pH 6)	4,2 g Citrat Monohydrat ad 2 l Aqua dest. mit 2 n NaOH auf pH 6 einstellen

EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	700 ml Aqua dest. 186,1 g EDTA Di-Natrium-Dihydrat 20 g Natriumhydroxid (NaOH) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen pH 8,0 mit NaOH einstellen bei Raumtemperatur gelagert
Eisenchlorid-Lösung 30 %	1,2 g Eisenchlorid 4 ml Aqua dest.
Essigsäure 0,5 %	25 ml Essigsäure 100 % 4975 ml Aqua dest.
Ethanol 75 %	75 ml Ethanol reinst 25 ml RNase-freies Wasser
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung	40 µl Ethidiumbromid-Stammlösung ad 200 ml Aqua dest.
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg Ethidiumbromid ad 1 ml Aqua dest. bei 4 °C aufbewahrt
Formalin 3 %	1 l Formaldehydlösung 10 % 2 l Aqua bidest.
Giemsa-Gebrauchslösung	97,5 ml Kaliumdihydrogenphosphat (13,61 g in 1 l Aqua dest.) 2,5 ml Dinatriumhydrogenphosphat (17,8 g in 1 l Aqua dest.) mischen und erwärmen 7 ml Giemsa-Stammlösung auf pH-Wert 5,0 einstellen
Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung	180 ml Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung 20 ml Biebrich-Scharlach-Lösung (1 %)
Lithiumkarbonat-Lösung 0,5 %	1 g Lithiumkarbonat 200 ml Aqua dest.
SDS-Desinfektionslösung 10 %	10 g SDS granuliert, reinst 100 ml Aqua dest.

0,5 x TBE Puffer	54 g TRIS 27,5 g Borsäure 20 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) ad 10 l Aqua dest. bei Raumtemperatur gelagert
TBS Puffer (0,05 M, pH-Wert 7,6)	60,5 g TRIS in 700 ml Aqua dest. lösen mit 2 molarer Salzsäure auf pH 7,6 einstellen auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen pH-Wert prüfen 90 g NaCl darin lösen pH-Wert prüfen, auf pH 7,6 einstellen
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 3 %	6 ml Wasserstoffperoxid 30 % 60 ml Aqua bidest.
Wasserstoffperoxid 1 %	6 ml Wasserstoffperoxid 30 % 194 ml Aqua dest.
Weigerts-Eisen-Hämatoxylin- Gebrauchslösung	1 g Hämatoxylin 100 ml 95%iges Ethanol 4 ml 30%ige Eisenchlorid-Lösung 95 ml Aqua dest. 1 ml konzentrierte Salzsäure (37 %)

3.1.3. Geräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Abzug	Airflow-Control, Type: TA 1200V 900-900	Vinitex, Sint-Oedenrode, Niederlande
Ausgießstation	TBS 88 Paraffin Embedding System	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Einbettungsautomat	Histomaster 2050/DI	Bavimed, Birkenau
Elektrophorese- kammer	Mini-Sub [®] Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Flow	Flow Steril-Helios	Biohit, Mailand, Italien

Gel Dokumentation	Gel Doc 2000, Software: Quantity One 4.1.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Homogenisator	Ultra-Turrax [®]	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Homogenisator-Regler	Thyristor Regler TR 50	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Kamera (Mikroskop)	ColorView III, Soft Imaging System	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Mikroskop	Olympus BX51TF Software: analySIS FIVE	Olympus Imaging Europa GmbH, Hamburg
Mikroskop	Leica DMLS	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
Mikrowelle	Micro-Chef [®] Moulinex	Moulinex, Ecully, Frankreich
Pipettierhilfe	Accu-jet [®] <i>pro</i>	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe	10 µl Gilson pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	20 µl Gilson pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	100 µl Gilson pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	200 µl Gilson pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe	1000 µl Gilson pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer Küvette	Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil [®]	Hellma Optik GmbH, Jena
qPCR-Thermocycler	AB 7300 Real Time PCR System Software: 7300 System Sequence Detection Software 1.3.1.	Applied Biosystems, Darmstadt

Rasierer	Favorita II	Aesculap AG, Tuttlingen
Rotationsmikrotom	HM 315	Microm, Walldorf
Spannungsgerät	Power Supply Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermocycler (PCR- Gerät)	T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
UV-Strahlung zur Gelauswertung	UV-Crosslinker Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab [®] Labor Spezialprodukte, Heidelberg
Vortexer	Vortexer IKA [®] Works	IKA [®] Works Inc., Wilmington, USA
Waage	Mettler PC 400	Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz
Wärmeschrank	Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Wasserbad	Daglef Platz, Wankendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Micro Centrifuge	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.1.4. Sonstiges Material

Becherglas	DURAN Group GmbH, Mainz
Becherglas 100 ml	VWR International, Darmstadt
Biopsy Punch 4 mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main
Biosphere [®] Filter Tips 10 µl (Pipettenspitzen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere [®] Filter Tips 20 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere [®] Filter Tips 100 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere [®] Filter Tips 200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere [®] Filter Tips 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

CryoPure Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläschen (22 x 22 mm)	Spicker Laborbedarf GmbH, Schwandorf
Deckgläschen (18 x 24 mm)	R. Langenbrinck, Emmerdingen
Drahtnetz 8 x 8 cm mit 200 µm Maschenweite	Retsch GmbH & Co. KG, Haan
Drontal® Plus (Entwurmungsmittel)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Einbettkassetten 4 x 2,5 cm	VWR International, Darmstadt
Einmalpipetten	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethilon II (Nahtmaterial)	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Färbegestelle	VWR International, Darmstadt
Färbetröge	VWR International, Darmstadt
Gentle Skin® grip (Handschuhe)	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Glas-Baermann-Trichter (mit aufgesetztem Schlauchstück)	DURAN Group GmbH, Mainz
Kotröhrchen	Spicker Laborbedarf GmbH, Schwandorf
Messbecher 25 ml	VWR International, Darmstadt
Messbecher 50 ml	VWR International, Darmstadt
Messbecher 100 ml	VWR International, Darmstadt
Messbecher 200 ml	VWR International, Darmstadt
Messflasche 20 ml	Spicker Laborbedarf GmbH, Schwandorf
MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Microlance™ (Kanülen)	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Milbemax® (Entwurmungsmittel)	Novartis Tiergesundheit GmbH, München
Mullkompressen	Holthaus Medical GmbH & Co. KG, Remscheid
Multiply®-Pro 0,5ml Biosphere® (Reaktionsgefäß)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nitril 3000 (Handschuhe)	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Objektträger, entfettet (Histologie)	VWR International, Darmstadt

Objektträger StarFrost, silanisiert (Histologie)	VWR International, Darmstadt
Panacur [®] (Entwurmungsmittel)	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Parasiten-Diagnose-System	Janssen Animal Health, Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Petrischalen	DURAN Group GmbH, Mainz
Plastikdose mit Schraubverschluss, 50 ml	Carl Roth [®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PP-Tube 12 ml	Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Primerdesign, Programme	Primer Express [®] 3.0, Applied Biosystems, Darmstadt NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)
Profile Gel 3000 (sterile Handschuhe)	Nitritex Limited, Newmarket, UK
RNA Nano LabChip [®]	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Sägemehl	Altromin GmbH & Co. KG, Lage
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sarstedt Serological Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritze 1 ml	Becton Dickinson S. A., Madrid, Spanien
Spritze 2 ml	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Spritze 5 ml	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Spritze 10 ml	Becton Dickinson S. A., Fraga, Spanien
Standzylinder 250 ml (silikonisiert)	DURAN Group GmbH, Mainz (mit Silikonlösung ausgeschwenkt und über Nacht bei 100 °C eingebrannt)
Statistik-Programme	Graphpad Software, San Diego, USA
Stickstoff, flüssig	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Tesafilm	tesa AG, Hamburg
Trichter 55 mm (silikonisiert)	DURAN Group GmbH, Mainz (mit Silikonlösung ausgeschwenkt und über Nacht bei 100 °C eingebrannt)

Tube 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Verbandsmull	Rauscher, Pattensen
Wecker	TFA, Dostmann, Wertheim
Zellstoff	WDT, Hannover

3.1.5. Antikörper für die Immunhistochemie

Polyklonaler Kaninchen-anti-humane- CD3-ε-Ketten-Antikörper (Rb a CD3)	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Nr. A045201
Biotinylierte Ziege-anti-Kaninchen- IgG-Antikörper	VECTOR: BA-1000, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim

3.1.6. Primer

Gen	Oligo Nr. und Orientierung	Sequenz 5' → 3'
IL-4	1152 (s)	GCACTCACCAGCACCTTTGTC
	1153 (as)	CGTTTCTCGCTGTGAGGATGT
IL-10	1150 (s)	CCACGACCCAGACATCAAGA
	1162 (as)	TCCACCGCCTTGCTCTTATT
IFN-γ	1156 (s)	GCTTTGCGTGATTTTGTGTTCTT
	1157 (as)	CACCGTCCGATACATCTGGATTA
TGF-β	1158 (s)	GTATATGGCCCCCGAAGTTCTAG
	1159 (as)	CCCAGAATACTAAGCCCATTGC
18S rRNA	987 (s)	TCGGAACTGAGGCCATGATT
	988 (as)	TTTCGCTCTGGTCCGTCTTG

Tabelle 1: Auflistung der für die Studie verwendeten Primer.

3.1.7. Helminthen

T. vulpis (Peitschenwurm des Hundes und anderer Caniden)

U. stenocephala (Hakenwurm des Hundes)

3.1.8. Hunde

Zwölf Hunde neun verschiedener Rassen im Alter zwischen zwei und 13 Jahren aus privaten Haushalten.

3.2. Methoden

3.2.1. Einschlusskriterien der Hunde

Zwölf Hunde mit diagnostizierter nicht saisonaler atopischer Dermatitis wurden in diese Studie eingeschlossen. Alle Hunde gehörten zum Patientenstamm der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland, und lebten in verschiedenen Haushalten.

Die Diagnose der caninen atopischen Dermatitis wurde anhand einer kompatiblen Anamnese, klinischen Befunden und nach Ausschluss möglicher Differentialdiagnosen (DEBOER & HILLIER 2001, WILLEMSE 1986) gestellt. Außerdem wurden für die Diagnose die Kriterien nach Willemse herangezogen. Ein Hund mit atopischer Dermatitis sollte demnach mindestens je drei der folgenden Haupt- und Nebenkriterien erfüllen (Tabelle 2) (WILLEMSE 1986):

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Pruritus	Anfang der Symptome vor dem dritten Lebensjahr
Beteiligung des Gesichtes und/oder der Zehen	Gesichtsrötung und Cheilitis
Lichenifikation der Flexorseite des Tarsus und/oder der Extensorseite des Karpus	beidseitige Konjunktivitis
chronische oder chronisch-rezidivierende Dermatitis	oberflächliche Staphylokokken-Pyodermie
individuelle oder familiäre Geschichte einer atopischen Dermatitis	Hyperhidrose
Rasseprädisposition	positive Sofortreaktionen auf Umweltallergene im Intrakutantest
	erhöhtes allergen-spezifisches IgGd
	erhöhtes allergen-spezifische IgE

Tabelle 2: Willemse Kriterien.

Ein Befall mit Flöhen oder Sarkoptesmilben wurde durch eine effiziente Flohkontrolle (s. unten), Hautgeschabsel und Versuchstherapie gegen oberflächlich lebende Milben ausgeschlossen. Die Hunde wurden vor Studienbeginn mit Hilfe klinischer Untersuchungen und durch Beurteilung zytologischer Präparate auf das Vorhandensein von Sekundärinfektionen mit Bakterien oder Malassezien untersucht. Alle Besitzer hatten mit ihren Hunden eine achtwöchige Eliminationsdiät (selbstgekocht oder kommerziell) und im Anschluss eine Provokationsprobe durchgeführt, um das Vorliegen einer Futtermittelallergie auszuschließen. Glukokortikoide mussten sechs Wochen vor Studienbeginn abgesetzt werden. Während der Studie durften die Hunde weder Antibiotika noch ein Anthelminthikum erhalten.

Hunde mit einer zusätzlichen Futtermittelallergie mussten bereits mindestens drei Monate vorher auf einer konsequenten Eliminationsdiät gewesen sein und auch während der Studie auf dieser Diät bleiben. Bestand der Vorbericht einer Flohspeichelallergie oder zeigten die Hunde Symptome hierfür, so wurden sie monatlich mit Fipronil (Frontline® Spot on, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) behandelt. Eine symptomatische, den Juckreiz hemmende Therapie war während der Studie gestattet, wenn sie mehr als zwölf Wochen zuvor (bei Fettsäuren), mehr als vier Wochen zuvor (bei Antihistaminika) oder mehr als zwei Wochen zuvor (im Falle von Shampoo-Therapie) begonnen worden war. Die Hunde durften auch eine allergen-spezifische Immuntherapie erhalten, sofern diese bereits zwölf Monate im Voraus begonnen worden war. Eine Veränderung der Dosis oder Anwendungshäufigkeit dieser Therapien während des Versuches war nicht gestattet.

Direkt vor Eintritt in die Studie wurde von jedem Hund eine Sammelkotprobe, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen genommen worden war, auf Endoparasiten untersucht. Die Studie wurde nach Antragstellung durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Nummer: 55.2 – 1 – 54 – 2531 – 1 – 08).

3.2.2. Ausschlusskriterien der Hunde

Hunde, deren Kotuntersuchung auf Endoparasiten direkt vor dem Versuch positiv war, wurden nicht in die Studie aufgenommen. Das Vorliegen von systemischen Krankheiten wie Hyperadrenokortizismus, Hypothyreose oder Diabetes mellitus sowie von Pyodermien oder parasitären Hautkrankheiten, führte zum Ausschluss aus der Studie.

3.2.3. Randomisierung

Die Hunde wurden mit Hilfe einer Randomisierungstafel ursprünglich in vier Gruppen mit jeweils drei Hunden unterteilt. Allerdings wurde aufgrund von Nebenwirkungen die Dosis für den jeweils letzten Hund in den zwei Gruppen, die L3 von *U. stenocephala* erhalten sollten, auf 100 Larven verringert (s. 3.2.4. Behandlungsgruppen).

3.2.4. Behandlungsgruppen

Drei der zwölf Hunde erhielten 500 embryonierte Eier von *T. vulpis* (Peitschenwurm des Hundes). Drei weitere Hunde bekamen 2500 embryonierte Eier derselben Helminthenspezies. Die nächste Gruppe mit drei Hunden sollte 500 L3 und die letzte Gruppe von drei Hunden 2500 L3 von *U. stenocephala* (Hakenwurm des Hundes) erhalten. Als jedoch die ersten vier Hunde der *Uncinaria*-Gruppe (je zwei mit 500 L3 und zwei mit 2500 L3) drei Wochen nach Einschluss in die Studie Durchfall und/oder Erbrechen entwickelten, wurde die Dosis für die verbleibenden zwei Hunde, die in diese Gruppe eingeschlossen werden sollten, auf 100 L3 von *U. stenocephala* reduziert.

3.2.5. Studienprotokoll

Beim Eintritt in die Studie unterzeichneten die Besitzer der Hunde eine Einverständniserklärung. Es wurden monatliche Termine (Tag 0, Tag 30, Tag 60 und Tag 90) vereinbart. Am Tag 0 wurde eine klinische Allgemeinuntersuchung und eine dermatologische Untersuchung durchgeführt sowie ein Punktwert hinsichtlich des Schweregrades der Läsionen durch die atopische Dermatitis mit Hilfe eines CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index) ermittelt. Der CADESI ist ein in der Veterinärdermatologie weithin akzeptierter und validierter klinischer Punktwert (OLIVRY *et al.* 2007, OLIVRY *et al.* 2008). Außerdem erfolgte eine allgemeine Beurteilung des Hautzustandes durch den Besitzer. Hierbei konnte der Besitzer zwischen exzellent, gut, ausreichend und ungenügend wählen. Des Weiteren beurteilten die Patientenbesitzer den Juckreiz ihres Hundes subjektiv anhand einer visuellen Analogskala von 0 (gar kein Juckreiz) – 10 (schwerster Juckreiz). Am Tag des Eintritts wurden außerdem je drei Hautstanzen von vier Millimeter Durchmesser von jedem Hund unter Lokalanästhesie genommen (s. 3.2.6. Entnahme der Hautstanzen) und die entsprechende Helminthendosis oral mit einer Spritze verabreicht. Zwei der entnommenen Hautstanzen wurden sofort in flüssigem

Stickstoff (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung im gentechnischen Labor bei -80 °C gelagert. Von der dritten, in Formalin fixierten Probe wurden durch das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München histologische Schnitte angefertigt (s. 3.2.16. Histologie). Den Besitzern wurde nahegelegt, sich an allgemeine Hygienevorschriften zu halten und Kontakt mit dem Kot des Hundes zu vermeiden. Zu den monatlichen Kontrollterminen nach einem, zwei und drei Monaten wurden alle Hunde wieder einer klinischen Allgemeinuntersuchung und einer dermatologischen Untersuchung unterzogen. Außerdem wurde wiederum ein CADESI erhoben und die Besitzer wurden gebeten, den aktuellen Juckreiz anhand der Juckreizskala zu beurteilen. Die CADESI-Werte wurden von Tierärzten ermittelt, denen die Behandlungsgruppe, der der jeweilige Hund angehörte, unbekannt war. Jegliche unerwünschte Wirkung durch Verabreichung der Helminthen, wie etwa Durchfall oder Erbrechen, wurde aufgezeichnet und nach Indikation behandelt. Die Patientenbesitzer wurden gebeten, zu jedem monatlichen Kontrolltermin eine Sammelkotprobe von drei aufeinanderfolgenden Tagen mitzubringen, die im Labor der Medizinischen Kleintierklinik auf Endoparasiten untersucht wurde (s. 3.2.18. Kotuntersuchungen im Flotationsverfahren). Zum letzten Studientermin nach drei Monaten (Tag 90) wurden zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen erneut drei Hautbiopsate mit einem Durchmesser von vier Millimetern genommen. Auch von diesen drei Hautstanzen wurden zwei sofort in flüssigen Stickstoff verbracht und bei -80 °C gelagert, während aus der dritten histologische Schnitte angefertigt wurden. Außerdem erfolgte zum Abschluss wieder eine allgemeine Beurteilung des Hautzustandes durch den Besitzer. Am Ende des letzten Kontrolltermins wurden alle Hunde entweder mit einem Präparat aus Febantel, Pyrantelmonat und Praziquantel (Drontal® Plus, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), einem Präparat mit Milbemycinoxim und Praziquantel (Milbemax®, Novartis Tiergesundheit GmbH, München, Deutschland) oder mit Fenbendazol (Panacur®, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) nach Körpergewicht und Herstellerangaben entwurmt. Zwei Wochen nachdem alle Hunde die Studie abgeschlossen hatten und entwurmt worden waren, wurden die Besitzer erneut gebeten eine Sammelkotprobe abzugeben, um den Erfolg der Entwurmung zu überprüfen.

3.2.6. Entnahme der Hautstanzen

Für die Entnahme der Hautstanzen wurde pathologisch veränderte Haut gewählt. Diese Körperareale zeigten Rötung, Hyperpigmentation und/oder Lichenifikation in unterschiedlicher Ausprägung. Alle Hautstanzen wurden im Bereich des ventralen Abdomens oder im Inguinalbereich genommen. Hierfür wurden die Hunde zunächst an einer kleinen Stelle rasiert und die Haut mit Tesafilm (tesa AG, Hamburg, Deutschland) abgetupft, um oberflächliche Hautschuppen und Keime zu entfernen. Dann wurde die Haut lokal durch eine subkutane Injektion mit 2%igem Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 2 %, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) anästhesiert. Vor der Entnahme der Biopsien erfolgte eine Desinfektion der Haut mit Alkohol (Ethanol 95 %, CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland) und Vet-Sept® Spray (A. Albrecht GmbH, Aulendorf, Deutschland). Für die Durchführung der Hautstanzen wurden sterile Biopsiestanzen mit einem Durchmesser von vier Millimetern (Biopsy Punch 4 mm, Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) und steriles Instrumentarium (Schere, Pinzette, Nadelhalter) verwendet. Zwei der Hautbiopsien wurden sofort nach der Entnahme mit einer sterilen Pinzette in je ein Kryoröhrchen (CryoPure Röhrchen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) platziert und dann unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung im gentechnischen Labor wurden die Proben anschließend bei -80 °C in einer Tiefkühltruhe gelagert. Die dritte Hautstanze wurde zur Fixierung in Formalin platziert und an das Institut für Tierpathologie weitergegeben, in dem histologische Schnitte angefertigt wurden.

3.2.7. RNA-Präparation

Bei der RNA-Präparation wurde nur mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen gearbeitet, um die Gefahr einer Degradierung der RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu vermeiden. Geräte, Gegenstände und Arbeitsoberflächen wurden vor dem Arbeitsbeginn mit 10%iger SDS-Desinfektionslösung (s. 3.1.2. Lösungen) abgewischt.

Um Gesamt-RNA aus Hautzellen zu gewinnen, wurden sie durch Trifast™-Reagenz (peqGOLD Trifast™, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) lysiert. Dabei blieb die Integrität der RNA erhalten. Die in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagerten Gewebestückchen (Hautstanzen mit vier Millimeter Durchmesser) wurden in flüssigem

Stickstoff transportiert und mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax[®], Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen, Deutschland) sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoff in 1 ml Trifast[™]-Reagenz aufgeschlossen. Nach 30 Sekunden langem Homogenisieren wurden die Proben auf Eis gekühlt, um deren Überhitzung zu vermeiden. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jeder Probe 200 µl Chloroform (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) pipetiert und das Gemisch anschließend 15 Sekunden stark geschüttelt. Danach erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten. Die einsetzende Phasentrennung wurde durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 12000 x g beschleunigt. Nach dem Zentrifugieren waren die Medien deutlich in eine obere, wässrige, RNA-haltige Phase, eine Interphase mit DNA und eine untere, Protein-haltige Phase getrennt. Die obere, wässrige, RNA-haltige Schicht wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gefällt. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Gemisch zur Präzipitation der RNA zehn Minuten bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA mit 1 ml 75%igem Ethanol (s. 3.2.1. Lösungen) gewaschen und erneut fünf Minuten bei 4 °C und 7600 x g zentrifugiert. Das RNA-Präzipitat wurde getrocknet und in 15 µl RNase-freiem Wasser (Wasser für die Molekularbiologie, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Die RNA wurde entweder sofort in weiteren Analysen eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.2.8. Bioanalyzer

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit dem Agilent RNA 6000 Eukaryonten Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) anhand der sogenannten RNA Integritätsnummer (RIN) bestimmt. Für die qPCR sollte nur RNA von guter und sehr guter Qualität in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Daher wurde in weiteren Verarbeitungsschritten nur RNA mit einer entsprechend hohen RIN von 7,5 – 10 eingesetzt.

Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamt-RNA sind die Banden von 5S, 18S und 28S rRNA zu erkennen (Abbildung 6).

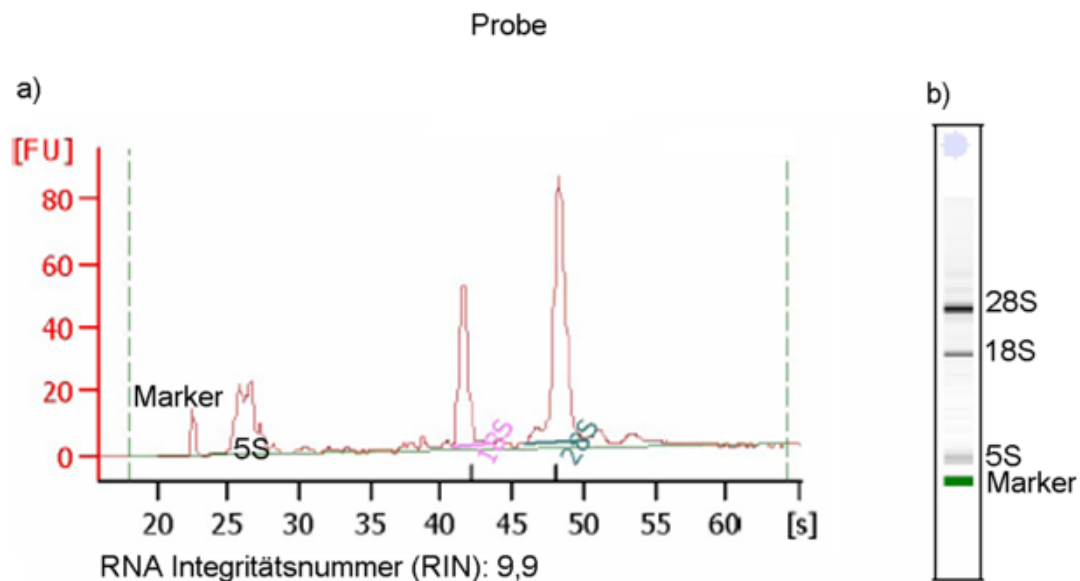


Abbildung 6: a) Elektrophoretische Darstellung der aufgeschlüsselten Gesamt-RNA im zeitlichen Verlauf. Deutlich zu sehen sind die Spitzen von 5S, 18S und 28S rRNA. Auf der y-Achse sind die fluoreszierenden Einheiten (FU), auf der x-Achse die Zeit in Sekunden [s] aufgetragen. Die RNA Integritätsnummer dieser Probe betrug 9,9. b) Spezifische Banden für 5S, 18S und 28S rRNA auf einem Agarosegel.

Alle verwendeten Reagenzien wurden vor Durchführung der Analyse im Bioanalyzer für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Medien des Agilent RNA 6000 Eukaryonten Nano Kits waren dabei ständig vor Licht geschützt. Direkt vor Beginn der Probenbearbeitung wurden die Elektroden des Bioanalyzers mittels zweier Reinigungschips zuerst mit RNaseZAP® Flüssigkeit (Ambion Inc., Austin, USA) und anschließend mit RNase-freiem Wasser gereinigt.

Vorbereitung des Gels

550 µl der RNA 6000 Nano Gel Matrix wurden in einen Spinfilter pipettiert. Daraufhin wurde das Gel für zehn Minuten bei Raumtemperatur und 1500 x g zentrifugiert. 65 µl des gefilterten Gels wurden nach der Zentrifugation in ein 0,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß (Multiply[®]-Pro 0,5 ml Biosphere[®], Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert. Das gefilterte Gel konnte vier Wochen lang für Analysen verwendet werden.

Vorbereitung des Gel-Dye-Mixes

Das RNA 6000 Nano Dye Konzentrat wurde für zehn Sekunden gevortext, danach abzentrifugiert und 1 µl des Konzentrats zu 65 µl des gefilterten Gels pipettiert. Der Gel-Dye-Mix wurde dann einige Sekunden gevortext und bei Raumtemperatur für zehn Minuten mit 13000 x g zentrifugiert.

Auftragen des Gel-Dye-Mixes

Zunächst wurde ein neuer RNA 6000 Nano Chip in die Chip Priming Station eingesetzt. 9 µl des Gel-Dye-Mixes wurden in eine speziell dafür gekennzeichnete Vertiefung des Chips pipettiert und die Chip Priming Station geschlossen. Der Gel-Dye-Mix verteilte sich in 30 Sekunden unter konstantem Druck im Chip. Nach dem Öffnen der Chip Priming Station wurden erneut jeweils 9 µl des Gel-Dye-Mixes in zwei andere Vertiefungen des Chips pipettiert.

Auftragen des Markers

In alle zwölf für die RNA-Proben vorgesehenen Vertiefungen des Chips sowie in die Vertiefung für die Leiter wurden jeweils 5 µl des RNA 6000 Nano Markers pipettiert.

Auftragen der Leiter und der RNA-Proben

1 µl der Leiter wurde in die dafür gekennzeichnete Vertiefung pipettiert. In die für die RNA-Proben vorgesehenen Vertiefungen wurde jeweils 1 µl RNA pipettiert. Der Chip wurde anschließend für eine Minute bei 2400 U/min gevortext, binnen fünf Minuten in den Agilent 2100 Bioanalyser eingesetzt und die Analyse gestartet.

3.2.9. Konzentrationsbestimmung von RNA

Durch photometrische Messung im BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde die Konzentration der gelösten Gesamt-RNA bestimmt. Die Messung der 1:100 verdünnten RNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen das Lösungsmittel (Leerwert für RNA). Zur Messung des Leerwertes wurden 100 µl RNase-freies Wasser eingesetzt.

3.2.10. cDNA-Synthese

Zur Genexpressionsanalyse mittels qPCR musste zunächst die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das Reagenziensystem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. In diesem sind sowohl Random Hexamer Primer als auch Oligo-dT Primer enthalten. Random Hexamer Primer sind kurze, nach dem Zufallsprinzip synthetisierte Oligonukleotide, die an die gesamte RNA (rRNA, tRNA, mRNA) binden. Die Verwendung dieser Random Hexamer Primer macht den Einsatz von 18S rRNA als Referenzgen möglich. Oligo-dT Primer lagern sich dagegen an den Poly-A-Schwanz der mRNA an und schreiben ausschließlich mRNA um.

Nach der Elimination genomischer DNA (gDNA) wurden 0,5 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (RT). Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

3.2.10.1. Elimination genomischer DNA

Zur Elimination genomischer DNA wurden je Probe folgende Komponenten in 0,5 ml RNase-freie Reaktionsgefäße gegeben:

gDNA Wipeout Puffer (7 x):	2 µl
Gesamt-RNA:	0,5 µg
RNase-freies Wasser:	ad 14 µl
Gesamtvolumen:	14 µl

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend für zwei Minuten bei 42 °C in einem PCR-Gerät (T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt.

3.2.10.2. Reverse Transkription (RT)

Für die RT wurde entsprechend den Herstellerangaben folgender Reaktionsansatz benutzt (einfacher Ansatz):

Quantiscript Reverse Transkriptase:	1 µl
Quantiscript RT Puffer (5 x):	4 µl
RT Primer Mix:	1 µl
Gesamtvolumen:	6 µl

Die 6 µl des RT-Reaktionsansatzes wurden zu den 14 µl der gDNA-Eliminationsreaktion gegeben. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 20 µl.

Die RT wurde im PCR-Gerät nach folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

RT:	30 Minuten bei 42 °C
Inaktivierung des Enzyms:	3 Minuten bei 95 °C
Abkühlung auf 4 °C	

Das Gesamtvolumen der cDNA-Synthese (20 µl) wurde für die qPCR mit RNase-freiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Die cDNA-Proben wurden anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder direkt in der qPCR zur Analyse der Zytokinexpression verwendet.

3.2.11. Primer für die quantitative Polymerasekettenreaktion

Die eingesetzten Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und für das Referenzgen 18S rRNA wurden bereits in einer vorhergehenden Studie von STEHLE *et al.* (2007) designed und etabliert (STEHLE *et al.* 2007). In dieser Studie kamen die Primer für IL-10 nicht zum Einsatz. Daher wurde ihre Effizienz und Spezifität in der vorliegenden Arbeit erneut verifiziert.

3.2.11.1. Primerdesign

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer Express[®] 3.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) designed, wobei für die Verwendung in der qPCR spezielle Anforderungen an die Eigenschaften der Primer gestellt wurden. Wegen der Interkalierung von SYBR Green mit doppelsträngiger DNA ist es von Bedeutung, dass die Primerpaare möglichst keine Dimere mit sich selbst oder mit dem jeweils zweiten Primer bilden, da die Dimere bei der Fluoreszenzmessung sonst mitgemessen würden. Alle eingesetzten Primer hatten eine Basenpaarlänge (bp) von 18 – 24 bp. Die Annealing Temperatur betrug bei allen verwendeten Primern 59 °C. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie ein Amplifikat generierten, das zwischen 100 und 150 bp lag. Mit Hilfe des Programms NCBI Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) wurden die Primer mit in den Datenbanken vorhandenen Einträgen verglichen, um ein möglichst spezifisches Primerpaar für das gesuchte Gen zu erhalten. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG, Ebersberg, Deutschland. In folgender Tabelle sind die Primer und deren Eigenschaften aufgelistet (die Sequenz der Primer kann Tabelle 1 entnommen werden):

Gen	Oligo Nr. und Orientierung	Basenpaar-länge (bp)	Annealing Temperatur (°C)	Effizienz
IL-4	1152 (s)	21	59 °C	1,907
	1153 (as)	21	59 °C	
IL-10	1150 (s)	20	59 °C	1,86
	1162 (as)	20	59 °C	
IFN- γ	1156 (s)	23	59 °C	1,848
	1157 (as)	23	59 °C	
TGF- β	1158 (s)	23	59 °C	1,876
	1159 (as)	22	59 °C	
18S rRNA	987 (s)	20	59 °C	1,770
	988 (as)	20	59 °C	

Tabelle 3: Aufstellung der in der qPCR verwendeten Primer und deren Eigenschaften.

3.2.11.2. Etablierung der Primer für IL-10

Vor ihrem Einsatz in der qPCR wurden die IL-10 Primer, wie in diesem Abschnitt beschrieben, in einer PCR mit der Hot FIREPol® Polymerase (Solis Biodyne, Tartu, Estland) auf caniner cDNA getestet und das PCR-Produkt der Primer in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Die cDNA wurde aus Makrophagen generiert, die zuvor mit LPS stimuliert worden waren. Im Agarosegel zeigte sich nur eine distinkte Bande in der zu erwartenden Größe. Anschließend wurde von diesem PCR-Produkt eine log10-Verdünnungsreihe pipettiert und für die Erstellung einer Standardkurve in der qPCR eingesetzt, in deren Anschluss eine Schmelzkurvenanalyse (Dissoziationskurve) durchgeführt wurde. Hier war nur ein spezifisches Amplifikat zu erkennen. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und die erhaltene Sequenz mit Einträgen in der Datenbank verglichen. Dieser letzte Schritt erfolgte für alle Primer bereits in der Studie von STEHLE *et al.* (2007) (STEHLE *et al.* 2007).

3.2.11.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR kam es durch eine thermostabile DNA-Polymerase mit Hilfe spezifischer Primer zur Amplifizierung einer ganz bestimmten cDNA-Sequenz. Für die Hot FIREPol® PCR wurde ein Reaktionsansatz aus folgenden Reagenzien gebraucht (einfacher Ansatz):

7,6 µl	Wasser
1,2 µl	MgCl ₂ (25mM)
1,5 µl	10 x Puffer B
1,5 µl	dNTP Mix (20mM)
1,0 µl	Primer (s) (5µM)
1,0 µl	Primer (as) (5µM)
0,2 µl	Hot FIREPol® Polymerase (5 U/µl)

Zu diesem Reaktionsansatz wurde anschließend 1 µl der gewünschten cDNA oder 1 µl Wasser (als Negativkontrolle) in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

Die Hot FIREPol[®] PCR wurde im PCR-Gerät nach folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt:

Aktivierung der DNA-Polymerase:	96 °C, 15 Minuten
35 Zyklen: Denaturierung der DNA:	96 °C, 30 Sekunden
Bindung der Primer:	59 °C, 30 Sekunden
Elongation:	72 °C, 2 Minuten
letzter Elongationsschritt:	72 °C, 10 Minuten
Abkühlung auf 4 °C	

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt entweder bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt oder bei -20 °C eingefroren.

3.2.11.2.2. Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes in einem 2%igen Agarosegel, wurde die benötigte Menge peqGOLD Universal Agarose (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Aufkochen in einer Mikrowelle in 0,5 x TBE Puffer (s. 3.1.2. Lösungen) gelöst und anschließend in eine Elektrophoresekammer (Mini-Sub[®] Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit Probentaschenkamm gegossen. Nachdem das Agarosegel erstarrt war, wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 0,5 x TBE Puffer überschichtet. Zu 5 µl des PCR-Produktes wurde 1 µl sechsfach konzentrierter Ladepuffer (6 x Loading Dye Solution, Fermentas, Ontario, Kanada) pipettiert und in die vorhandenen Taschen des Agarosegels gegeben. Durch die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe konnte abgeschätzt werden, wie weit die Proben durch die Elektrophorese bereits aufgetrennt waren. Es wurde eine konstante Spannung (Spannungsgerät Power Supply Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) von 85 V angelegt. War das Gemisch ausreichend weit aufgetrennt, wurde das Gel für 30 Minuten in einer Ethidiumbromid-Gebrauchslösung (s. 3.1.2. Lösungen) unter Schwenken gefärbt. Die aufgetrennte DNA wurde anschließend unter UV-Licht (UV-Crosslinker Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) sichtbar gemacht und ihre Größe durch Vergleich mit einem mit aufgetragenen und gefärbten Marker (GeneRuler[™] 50bp DNA Ladder, Fermentas, Ontario, Kanada) bestimmt.

3.2.11.2.3. Ermittlung der Effizienz anhand von Standardkurven

Die Effizienz eines Primerpaares besagt, wie oft eine Matrize im Laufe eines PCR-Zyklus amplifiziert wird. Im Idealfall kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung. Dies würde einer Effizienz von 2 entsprechen. Allerdings liegen die Effizienz-Werte meistens nur zwischen 1,7 und 1,9. Die Bestimmung der Effizienzen der eingesetzten Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA erfolgte in einer vorhergehenden Studie von STEHLE *et al.* (2007) (STEHLE *et al.* 2007). Da die IL-10 Primer in dieser Studie nicht zum Einsatz kamen, wurde die Effizienz der IL-10 Primer im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt. Die Ermittlung der Effizienz erfolgte anhand von Standardkurven in der qPCR. Zur Erstellung einer Standardkurve in der qPCR wurde vom PCR-Produkt eine log₁₀-Verdünnungsreihe über neun Stufen, beginnend mit einer Verdünnung von 1:10, pipettiert. Von dieser Verdünnungsreihe wurden die letzten sieben Stufen als Matrize in der qPCR eingesetzt und deren Amplifikationskurven dargestellt (Abbildung 7).

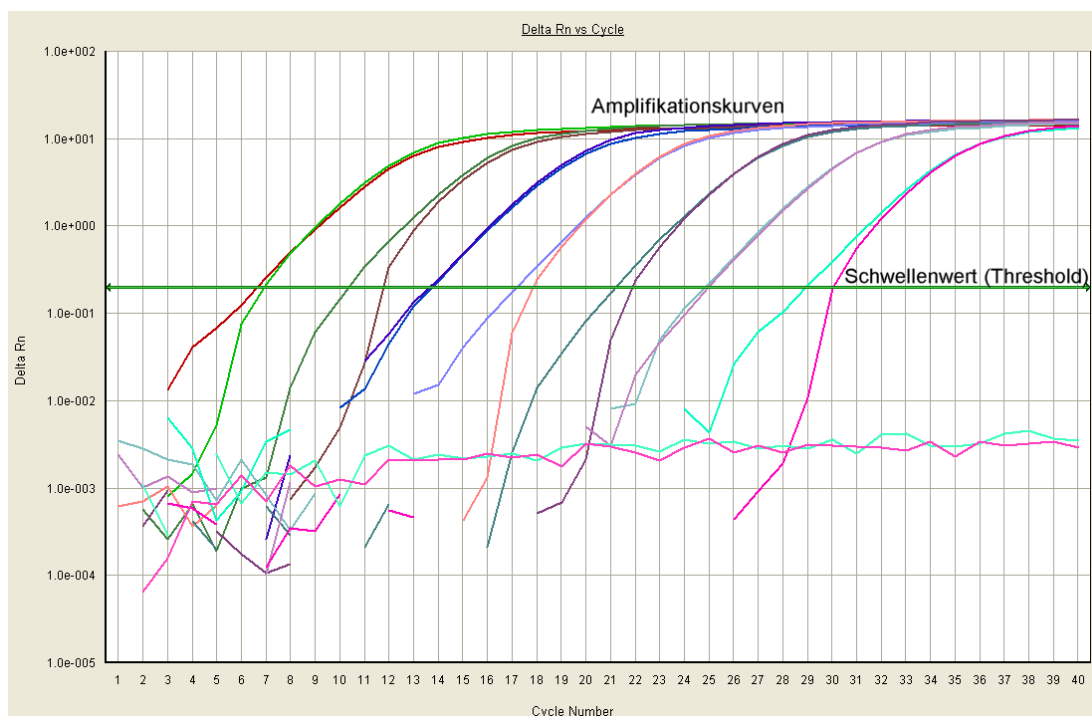


Abbildung 7: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe. Die letzten sieben Stufen einer log₁₀-Verdünnungsreihe wurden als Matrize in der qPCR eingesetzt. Als „Cycle threshold“ (Ct)-Wert wird die Anzahl der PCR-Zyklen bezeichnet, bei der die jeweilige Amplifikationskurve den Schwellenwert (Threshold) schneidet (s. 3.2.12.2. Auswertung der qPCR-Daten).

Für die Bestimmung der Effizienz wurden die „Cycle threshold“ (Ct)-Werte der log10-Verdünnungsreihe gegen die Verdünnungsstufen in einer Standardkurve aufgetragen (s. 4.3.2. Ermittlung der Effizienz) und rechnerisch daraus die Steigung der Trendlinie mit der Gleichung

$$y = mx + t$$

(mit m als Steigung der Geraden und t als y-Achsenabschnitt) ermittelt.

Die Effizienz E des Primerpaares errechnete sich dann mit der Gleichung:

$$E = 10^{|1/m|}$$

Um auszuschließen, dass die IL-10 Primer ein unspezifisches Amplifikat bildeten, musste eine Schmelzkurvenanalyse in der qPCR angeschlossen werden. Anhand der dabei entstandenen Dissoziationskurve (Abbildung 8) konnte man erkennen, ob ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde und ob Primerdimere oder Kontaminationen vorlagen.

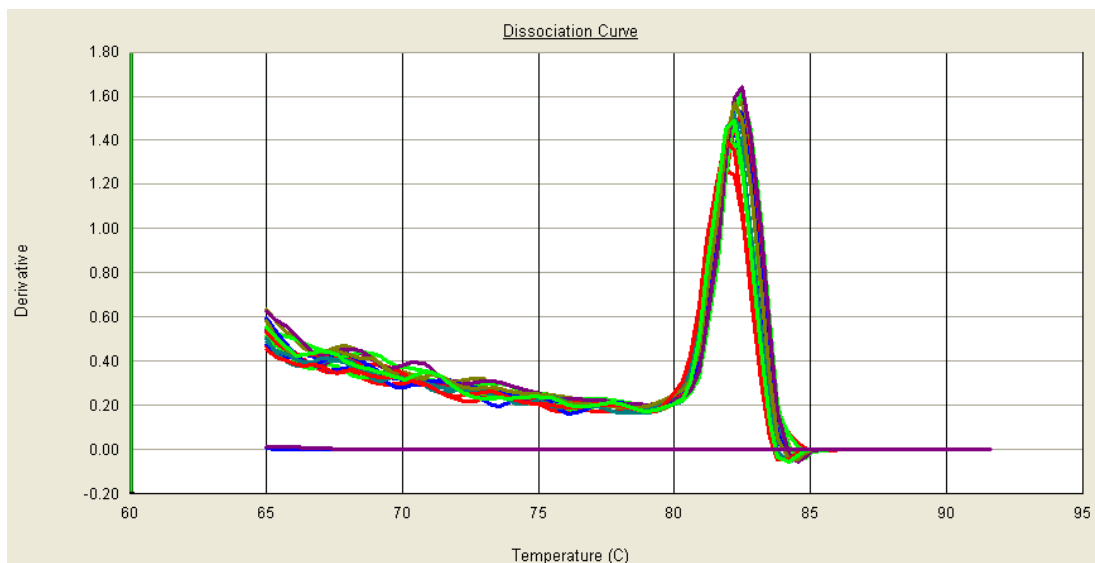


Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse der IL-10 Primer. Die Dissoziationskurve zeigt, dass nur ein spezifisches Amplifikat gebildet wurde. Die Linien im Bereich des Null-Wertes stellen die Negativkontrollen dar.

3.2.11.2.4. Prüfung der Primer mittels Sequenzierung

Das PCR-Produkt wurde durch die Firma GATC, Konstanz, Deutschland, sequenziert. Nach Erhalt der Daten wurde die Sequenz mit öffentlichen Sequenzdatenbanken (Programm NCBI Blast) abgeglichen, um zu prüfen, ob das Primerpaar für das gesuchte Gen (Zytokin) spezifisch war. Dies geschah für alle in der vorliegenden Studie eingesetzten Primer in der Arbeit von STEHLE *et al.* (2007) (STEHLE *et al.* 2007).

3.2.12. Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich eine Quantifizierung ermöglicht. Diese Quantifizierung wird mittels Fluoreszenzmessungen in jedem PCR-Zyklus durchgeführt. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde der mit doppelsträngiger DNA interkalierende Farbstoff SYBR Green (QuantiTect® SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Dadurch nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der Amplifikate zu. Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie viel höher oder niedriger die mRNA von IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β in der Hundehaut nach der Therapie mit den Helminthen im Vergleich zur Haut vor der Therapie (Referenzgewebe) exprimiert wird, wurden die in cDNA umgeschriebenen Proben der Hundehaut mit Hilfe Zytokin-spezifischer Primer in der qPCR analysiert.

3.2.12.1. Durchführung

Zunächst wurde ein Reaktionsansatz ohne Zugabe der cDNA auf Eis pipettiert, in den ein etwa 10%iger Pipettierverlust einkalkuliert wurde. Der einfache Ansatz für drei Triplikate von je 25 μ l für die qPCR setzte sich wie folgt zusammen:

Primer (s) (5 μ M):	4,95 μ l
Primer (as) (5 μ M):	4,95 μ l
Wasser:	28,05 μ l
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	41,25 μ l
Gesamtvolumen:	79,2 μl

Dazu wurden 3,3 μ l der jeweiligen cDNA pipettiert. Für die Negativkontrollen wurden 3,3 μ l RNase-freies Wasser zugegeben.

Im Anschluss wurde das Gemisch (Reaktionsansatz und cDNA bzw. Wasser) in Triplikaten zu jeweils 25 µl auf drei Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verteilt und die Platte mit einer optisch durchlässigen Folie verschlossen.

Die qPCR und Schmelzkurvenanalyse fand im AB 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) statt. Durch die an die eigentliche PCR angeschlossene Schmelzkurvenanalyse konnten Kontaminationen und unspezifische Amplifikate detektiert werden.

Die qPCR lief nach folgendem Temperaturprotokoll ab:

Aktivierung der DNA-Polymerase:	95 °C, 15 Minuten
45 Zyklen: Denaturierung:	94 °C, 15 Sekunden
Annealing:	59 °C, 30 Sekunden
Extension/Fluoreszenzmessung:	72 °C, 30 Sekunden
Schmelzkurvenanalyse:	schrittweise Temperaturerhöhung von 57 °C auf 95 °C

3.2.12.2. Auswertung der qPCR-Daten

Während einer qPCR werden verschiedene Phasen durchlaufen (Abbildung 9). In der Hintergrundphase einer qPCR ist die Matrizen (cDNA)-Menge begrenzt. Die Zunahme an Fluoreszenz ist noch zu gering, um sicher vom Gerät detektiert zu werden. Diese Zyklen werden im Gerät als Basislinie definiert. Derjenige Zyklus, bei dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert (Threshold) erreicht, der sich in der exponentiellen Phase befinden sollte, wird als Schwellenwert-Zyklus oder Ct-Wert bezeichnet. In der Linearphase steigt die Menge der qPCR-Produkte linear an. In der folgenden Plateauphase kommt es zu keiner weiteren Amplifizierung mehr. Der Schwellenwert muss in der Exponentialphase liegen, weil nur in dieser Phase die PCR von der eingesetzten Menge an cDNA abhängig ist und deshalb nur hier eine Vergleichbarkeit gegeben ist.

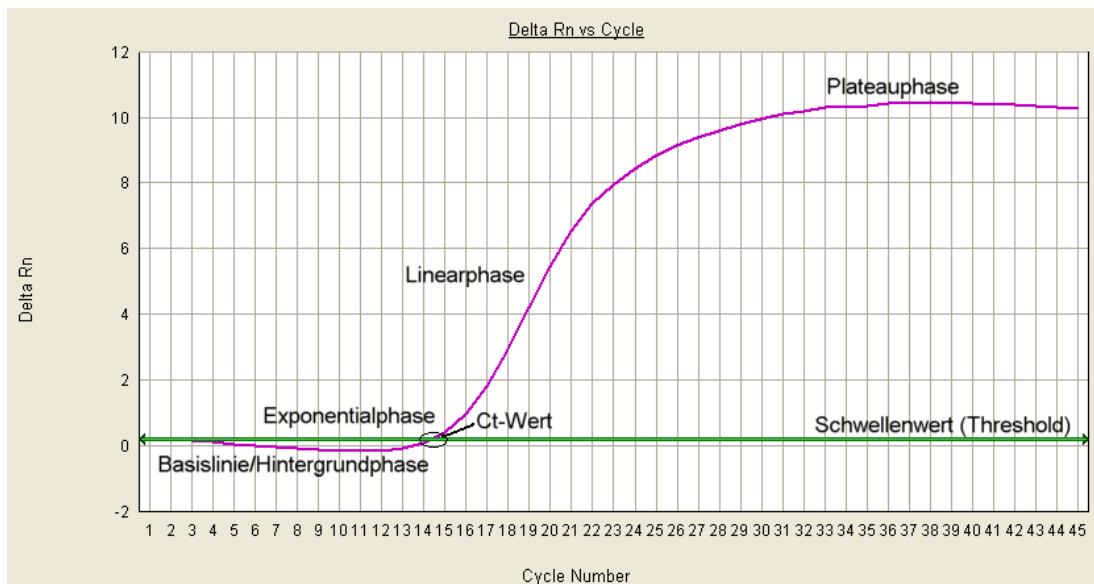


Abbildung 9: Verschiedene Phasen, die während einer qPCR durchlaufen werden. Als Ct-Wert bezeichnet man die Zykluszahl, zu der die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet.

Die ermittelten Ct-Werte wurden für eine relative Quantifizierung benutzt. Aus den Ct-Werten der in Triplikaten pipettierten Proben wurde der Mittelwert (MW) gebildet. Von diesem wurde der Mittelwert der Ct-Werte des Referenzgens desselben Gewebes abgezogen. Die Wahl eines geeigneten Referenzgens ist ein wichtiger Aspekt des Versuches, da es entscheidend für die Gesamtanalyse ist. Am besten war hierfür 18S rRNA geeignet. Der durch Subtraktion der beiden Mittelwerte resultierende, auf das Referenzgen 18S rRNA normalisierte Wert, wurde als ΔCt bezeichnet (Normalisierung).

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Gen X/Gewebe A}} = \text{MW}(\text{Ct}_{\text{Gen X/Gewebe A}}) - \text{MW}(\text{Ct}_{18\text{S rRNA/Gewebe A}})$$

Der ΔCt -Wert des Referenzgewebes (Haut eines Hundes vor Helminthen-Therapie) wurde vom ΔCt -Wert des mit diesem zu vergleichenden Gewebes (Haut des jeweils selben Hundes nach Helminthen-Therapie) abgezogen (Kalibrierung). Der dadurch ermittelte Wert wurde als $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert bezeichnet. Da es in dieser Studie keine Kontrolle gab, ist das Referenzgewebe immer (auch im Folgenden) als die Haut des jeweiligen Hundes vor Verabreichung der Helminthen zu verstehen. Gewebe A steht allgemein für die Haut eines Hundes nach Beendigung der Studie (nach Verabreichung der Helminthen).

$$\Delta\Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} = \Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} - \Delta Ct_{\text{Gen X/Referenzgewebe}}$$

Mit Hilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes und der Effizienz E des für das bestimmte Gen (Zytokin) spezifischen Primerpaares lässt sich bestimmen, um wie viel höher oder niedriger ein Gen in einem Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe exprimiert wird. Dazu wurde folgende Gleichung benutzt:

$$n\text{-fache Expression (Probe nach der Therapie mit Helminthen im Vergleich zur Probe vor der Therapie mit Helminthen)} = E (\text{Effizienz})^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.13. Positivkontrolle der Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA

Um zu zeigen, dass die in diesem Versuch eingesetzten Primer für die Zytokine IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β sowie für das Referenzgen 18S rRNA reproduzierbar funktionieren, wurde eine Positivkontrolle generiert. Für die Positivkontrolle wurde canine cDNA von mit Con A stimulierten PBL gewählt. Hierbei erwartete man sich, dass alle Zytokine in der qPCR nachweisbar sind. Diese Zellen besitzen die Eigenschaft, die genannten Zytokine zu exprimieren. Die cDNA der PBL wurde als Matrize für einen Lauf in der qPCR eingesetzt. Die Proben wurden in Triplikaten pipettiert (s. 3.2.12.1. Durchführung).

3.2.14. Kontrolle der RNA in der Agarosegelelektrophorese

Die durch RNA-Präparation (s. 3.2.7. RNA-Präparation) aus vier Millimeter großen Hautstanzen von Hunden isolierte RNA wurde elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Damit sollte überprüft werden, ob sich im Gel deutliche Banden für 28S und 18S rRNA zeigen.

Vor dem Gießen des Agarosegels wurde die Elektrophoresekammer für 15 Minuten mit 3%igem H_2O_2 (s. 3.1.2. Lösungen) behandelt und danach mit Aqua bidest. ausgeschwenkt. Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde dann die entsprechende Menge peqGOLD Universal Agarose durch Aufkochen in einer Mikrowelle in 0,5 x TBE Puffer gelöst und in die so vorbereitete Elektrophoresekammer mit Probentaschenkamm gegossen. Nach Erstarren des Agarosegels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 0,5 x TBE Puffer überschichtet. 3 μ l der RNA-Proben wurden in 0,5 ml RNase-freie Reaktionsgefäße pipettiert und im PCR-Gerät für 15 Minuten auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten

auf Eis gekühlt. Zu den 3 µl RNA wurden im nächsten Schritt 3 µl eines zweifach konzentrierten Ladepuffers (2 x Loading Dye Solution für RNA Elektrophorese, Fermentas, Ontario, Kanada), der Ethidiumbromid enthielt, gegeben und in die vorhandenen Taschen des Agarosegels pipettiert. Es wurde eine konstante Spannung von 120 V für 25 Minuten angelegt. Die aufgetrennte RNA wurde anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.15. Detektion möglicher Inhibitoren im RNA-Extrakt

Zum Ausschluss von Inhibitoren in der RNA, die die cDNA-Synthese blockieren und somit zu Problemen im weiteren Ablauf des Versuchs hätten führen können, wurde eine mit der TrifastTM-Methode extrahierte RNA erneut mit Natriumacetat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gefällt. Anschließend wurde sie in cDNA umgeschrieben und als Matrize in der qPCR eingesetzt. Diese, zusätzlich mit Natriumacetat gefällte RNA, sollte mit der durch die TrifastTM-Methode isolierten RNA des gleichen Hundes verglichen werden.

3.2.15.1. Fällung der RNA mit Natriumacetat

Für die Fällung mit Natriumacetat wurde eine RNA von sehr guter Qualität (RIN 9,1, s. 3.2.8. Bioanalyzer) gewählt. Ein Teil RNA-Lösung wurde mit einem Teil Isopropanol gemischt. Dazu wurde 1/10 Teil Natriumacetat (3 M) pipettiert. Nach einer 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, während der die RNA ausfiel und präzipitierte, wurde das Gemisch anschließend für zehn Minuten bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Danach wurde das RNA-Präzipitat mit 100 µl 75%igem Ethanol gewaschen und fünf Minuten bei 4 °C mit 7600 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNA getrocknet und in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Es wurde ausschließlich mit RNase-freiem Einwegmaterial und Handschuhen gearbeitet. Geräte, Gegenstände und Arbeitsoberflächen wurden vor dem Arbeitsbeginn mit 10%iger SDS-Desinfektionslösung abgewischt.

3.2.15.2. cDNA-Synthese und qPCR

Die Konzentrationen der mit TrifastTM-Reagenz isolierten RNA und der zusätzlich mit Natriumacetat gefällten RNA desselben Hundes wurden zunächst photometrisch bestimmt (s. 3.2.9. Konzentrationsbestimmung von RNA). Anschließend wurden die beiden RNAs für einen Lauf in der qPCR in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.10. cDNA-Synthese). Die qPCR wurde mit den 18S rRNA Primern durchgeführt und in

Triplikaten pipettiert (s. 3.2.12.1. Durchführung). Hierbei wollte man sehen, ob Unterschiede hinsichtlich der Ct-Werte (s. 3.2.12.2. Auswertung der qPCR-Daten) zu erkennen sind und somit Hinweise auf potentielle Inhibitoren der cDNA-Synthese vorliegen.

3.2.16. Histologie

Um festzustellen, ob das zelluläre entzündliche Infiltrat in der Haut (oberflächliche und tiefe Dermis) von atopischen Hunden durch die Verabreichung infektiöser Helminthenstadien beeinflusst werden kann, wurden bei Studienbeginn und nach Abschluss des Versuches histologische Präparate von Hautstanzen des jeweiligen Hundes angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Fixation der Schnitte erfolgte in der Medizinischen Kleintierklinik, die weiteren Schritte bis zum gefärbten histologischen Präparat wurden im Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Giemsa und Luna gefärbt. In der Giemsa-Färbung wurden die Mastzellen ausgezählt, in der Luna-Färbung die eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie die Lymphozyten. Für die Lymphozyten wurde außerdem eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe eines polyklonalen CD3-Antikörpers angefertigt.

3.2.16.1. Fixation

Alle entnommenen Hautstanzen wurden unmittelbar nach der Entnahme in 3%igem Formalin (s. 3.1.2. Lösungen) platziert. Darin wurden sie für 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert.

3.2.16.2. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Die Entwässerung und Einbettung in Paraffin (SAV LP, Flintsbach am Inn, Deutschland) erfolgte maschinell in einem Einbettungsautomaten (Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau, Deutschland). Der Vorgang lief nach folgendem Schema ab:

Spülen mit Aqua dest.:	30 Minuten
Ethanol 70 %:	2 x 1,5 Stunden
Ethanol 96 %:	2 x 1,5 Stunden
Ethanol 100 %:	2 x 1,5 Stunden
Xylol (Intermedium):	2 x 30 Minuten
Xylol:	1,5 Stunden
Paraffin bei 60 °C:	2 Stunden
Paraffin bei 60 °C:	3 Stunden

Danach wurden die Gewebeproben zur Herstellung von Paraffinblöcken an einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) ausgegossen. Von den Blöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM 315, Microm, Walldorf, Deutschland) 4 – 6 µm dicke Schnitte hergestellt. Nach dem Strecken der Schnitte im 40 °C warmen Wasserbad (Daglef Platz, Wankendorf, Deutschland) wurden diese auf entfettete Objektträger (VWR International, Darmstadt, Deutschland) aufgezogen. Im Anschluss trockneten die Schnitte für mindestens 24 Stunden bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland).

3.2.16.3. Färbung der Paraffinschnitte

Das Paraffin musste vor dem Färben mittels Xylol (Isomerengemisch, SAV LP, Flintsbach am Inn, Deutschland) aus den Schnitten entfernt werden. Dazu wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol gestellt. Anschließend folgte die Rehydrierung durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe: 2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, Aqua dest.

Die für die nachfolgend beschriebenen Färbeverfahren benötigten Lösungen werden unter 3.1.2. Lösungen aufgeführt.

3.2.16.3.1. Giemsa-Färbung

In der Färbung nach Giemsa werden Zellkerne unterschiedlich blau, eosinophile Granula (beispielsweise in Granulozyten) rot und Mastzellgranula rotviolett dargestellt.

Für die Färbung wurde wie folgt verfahren:

Giemsa-Gebrauchslösung bei 65 °C:	1 Stunde
Aqua dest. Spülung:	3 Sekunden
Differenzierung in Essigsäure 0,5 % bis zum Farbumschlag von Blau nach Rot:	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 Sekunden
2 x Ethanol 100 %:	je 2 Sekunden
Dehydrierung: Aqua dest.:	1 Sekunde
Ethanol 70 %:	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %:	2 x 1 Sekunde

Xylol in mehreren Portionen

(Isomerengemisch): insgesamt 1 Minute

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Eukitt (Roti[®]-Histokitt II, Carl Roth[®] GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

3.2.16.3.2. Luna-Färbung

Die Luna-Färbung ist besonders geeignet, um eosinophile Granulozyten und deren Granula darzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Färbung auch für die Zählung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten genutzt, da sich deren Kerne in dieser Färbung sehr deutlich anfärbten.

Direkt vor Beginn der Färbung musste die Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-Gebrauchslösung aus der Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Gebrauchslösung und einer 1%igen Biebrich-Scharlach-Lösung hergestellt werden.

Die Färbung verlief darauf nach folgendem Schema:

Hämatoxylin-Biebrich-Scharlach-

Gebrauchslösung: 5 Minuten

Differenzierung in 1%iger saurer

Alkohollösung bis die Kerne sich gut

darstellen: 8 x 1 Sekunde

abspülen mit Leitungswasser (zum

Entfernen des sauren Alkohols): 1 Minute

0,5 % Lithiumkarbonat-Lösung (bis zum

Farbumschlag nach Blau): 5 x 1 Sekunde

abspülen unter fließendem Wasser: 2 Minuten

Dehydrierung: Aqua dest.: 1 Sekunde

Ethanol 70 % 1 Sekunde

Ethanol 96 % 2 x 1 Sekunde

Ethanol 100 % 2 x 1 Sekunde

Xylol in mehreren Portionen

(Isomerengemisch): insgesamt 1 Minute

eindecken in Eukitt (s. oben)

3.2.16.4. Immunhistochemie

3.2.16.4.1. Allgemeines zur Methodik

Als Immunhistochemie wird in der Medizin und Biologie eine Methode bezeichnet, mit der Proteine anhand von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Für Antikörperfärbungen wird fixiertes Gewebe verwendet, beispielsweise Mikrotomschnitte von Organen. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einem bestimmten Epitop und erfolgt in Form einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der indirekten Methode wird in einem ersten Schritt ein spezifischer Antikörper, auch Primärantikörper genannt, auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Im nächsten Schritt wird ein sogenannter Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und löst durch eine Enzym-Substrat-Reaktion die Farbentstehung aus.

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe des polyklonalen CD3-Antikörpers A045201 (DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland, Nr. A045201) aus dem Kaninchen dienten dem Nachweis spezifischer Antigene von T-Zellen in der Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis. Zur Sichtbarmachung der Antikörperbindung wurde der Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain: PK-6100, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.16.4.2. Durchführung

Nach Einbettung in Paraffin und Herstellung der Schnitte (s. 3.2.16.2. Paraffin-einbettung und Schnittherstellung), wobei die Schnitte für die Immunhistochemie auf silanisierte Objektträger (StarFrost, VWR International, Darmstadt, Deutschland) aufgezogen wurden, musste das Paraffin aus den Schnitten entfernt werden. Hierfür wurden die Schnitte 20 Minuten in Xylol gestellt. Im Anschluss folgte die Rehydrierung durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 1 x 70 %, Aqua dest.) und das Demaskieren der Schnitte (Mikrowelle: 10 mM Citratpuffer pH 6,0 bei 700 Watt für 2 x 10 Minuten).

Alternativ zur Behandlung mit der Mikrowelle wurden die Schnitte zunächst in einer Target-Retrieval-Lösung (pH 9,9, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland, Nr. S3308) im vorgewärmten Wasserbad 20 Minuten bei 95 – 98 °C behandelt. Anschließend kühlten die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur ab und wurden vor der weiteren Bearbeitung kurz in Aqua dest. gespült.

Für die immunhistochemische Färbung wurde dann weiter wie folgt verfahren (die verwendeten Lösungen finden sich unter 3.1.2. Lösungen):

Blockierung der endogenen Peroxidase durch 1%iges H_2O_2 :	15 Minuten
spülen in TBS (0,05 M, pH 7,6):	10 Minuten
Blockierung der unspezifischen Bindungsstelle im Gewebe mit Ziegennormalserum, 1:10 verdünnt mit TBS:	30 Minuten
Inkubation (Raumtemperatur) mit dem Primärantikörper (Rb a CD3, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland, Nr. A045201), 1:100 verdünnt mit TBS:	1 Stunde
spülen in TBS:	10 Minuten
Inkubation (Raumtemperatur) mit dem Sekundärantikörper (biotinylierte Ziege a Kaninchen-IgG, VECTOR: BA-1000, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland), 1:200 verdünnt mit TBS:	1 Stunde
spülen in TBS:	10 Minuten
Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex, 1:100 verdünnt mit TBS:	30 Minuten
spülen in TBS:	10 Minuten
Chromogenreaktion mit Substrat DAB-Lösung (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland, Nr. 4170):	5 Minuten
spülen in fließendem Leitungswasser:	5 Minuten
gegenfärben mit Mayers Hämalalaun (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nr. A0884):	1 Minute
spülen in fließendem Leitungswasser:	5 Minuten
entwässern: Aqua dest.:	1 Sekunde
Ethanol 70 %:	1 Sekunde
Ethanol 96 %:	2 x 1 Sekunde
Ethanol 100 %:	2 x 1 Sekunde
Xylol in mehreren Portionen (Isomerengemisch):	insgesamt 1 Minute
eindecken in Eukitt (s. oben)	

3.2.16.5. Auswertung

Alle Schnitte wurden lichtmikroskopisch untersucht und mit Hilfe der Software *analySIS FIVE* (Olympus Imaging Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgewertet. Befanden sich auf einem Objektträger mehrere Anteile einer Hautstanze, wurde ein repräsentativer Anteil ausgewählt, mit Hilfe einer an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (*ColorView III*, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) fotografiert und im *analySIS* Programm dokumentiert. In einem ersten Schritt wurde die Fläche des Schnittes in μm^2 bestimmt. Dann wurden in den verschiedenen gefärbten Schnitten die gewünschten Zellen (Mastzellen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten) ausgezählt. Dies geschah für Mastzellen in der Giemsa-Färbung, für Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten in der Luna-Färbung. Zusätzlich wurde ein immunhistochemischer Nachweis von T-Lymphozyten in den Präparaten versucht, wofür sich die Präparate allerdings als nicht geeignet erwiesen. Um keine Zelle zu übersehen oder zweimal zu werten, wurden bereits gezählte Zellen mit Hilfe der *analySIS* Software markiert. Nach Ende der Auszählung errechnete das Programm automatisch die Summe der gezählten Zellen. Die Fläche des Schnittes und die bestimmte Zellzahl wurden in eine Microsoft Excel Tabelle übertragen und anschließend die Zellzahl pro Fläche (mm^2) berechnet. Die Zellzahl pro Fläche in einem Präparat aus einer Hautstanze des jeweiligen Hundes am Anfang der Studie wurde mit der Zellzahl pro Fläche eines Präparates desselben Hundes am Ende der Studie verglichen und statistisch ausgewertet.

3.2.17. Gewinnung und Lagerung der infektiösen Helminthenstadien

Die embryonierten Eier von *T. vulpis* sowie die L3 von *U. stenocephala* wurden der Medizinischen Kleintierklinik vom Institut für Parasitologie, Zentrum für Infektionsmedizin, der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt und fertig suspendiert in Leitungswasser zugesandt.

3.2.17.1. *Trichuris vulpis*

Für die Gewinnung von embryonierten Eiern von *T. vulpis* wurden patent infizierte Tiere anthelminthisch (Pyrantel in therapeutischer Dosierung) behandelt und anschließend an fünf Tagen die gesamte Tageskotmenge gesammelt und auf adulte Würmer durchgemustert. Die weiblichen Würmer wurden isoliert und diejenigen mit gefüllten Uteri ausgewählt. Die aus den Wurmern herausgelösten Uteri wurden zer-

stückelt und die entstandene Uterus-Ei-Suspension auf das Vorhandensein entwickelter Eier mit Hilfe eines Mikroskops überprüft. Uteri mit unreifen Eiern wurden verworfen. Im Anschluss wurde die Uterus-Ei-Suspension über ein Drahtnetz (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Deutschland) und einen silikonisierten Trichter (DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland) in einen silikonisierten Standzylinder (DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland) gespült und bei Raumtemperatur sedimentiert. Die Sedimentationsdauer betrug etwa zwölf bis 24 Stunden. Nach Absaugen des Überstandes wurde die konzentrierte Eiuspension in dünner Leitungswasserschicht in Petrischalen (DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland) gegeben. So wurde die Eiuspension bei 26 °C für vier bis fünf Wochen gehalten, um den Eiern Zeit für die Embryonierung zu geben. Für eine bessere Entwicklung wurden die Eier einmal wöchentlich mit einer Einmalpipette (Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) belüftet. Der Embryonierungserfolg wurde mikroskopisch anhand der beweglichen Larve im Ei überprüft und die Eier anschließend in der Petrischale mit Leitungswasser im Kühlschrank bei 4 – 8 °C gelagert. Die Eier wurden einmal wöchentlich belüftet und zur Vitalitätskontrolle regelmäßig überprüft.

3.2.17.2. *Uncinaria stenocephala*

Zur Züchtung von infektionsfähigen L3 von *U. stenocephala* wurde zunächst eine Kotkultur mit positiv auf Wurmeier getestetem Kot von Ausscheidertieren angesetzt. Hierfür wurde der Kot mit Sägemehl (Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) zu einer feuchtkrümeligen Masse verrührt, gegebenenfalls wurde mit Leitungswasser angefeuchtet. Das Kulturmedium wurde in ein Schraubglas überführt, bis dieses zu Dreivierteln gefüllt war und locker ein Deckel aufgelegt. Anschließend wurde dieses Gemisch in eine Klimakammer verbracht. Die Bebrütungszeit der Kotkultur betrug für *U. stenocephala* sieben bis zwölf Tage. Nach der definierten Bebrütungszeit konnten die Larven gewonnen werden. Das Glas wurde vorsichtig bis an den Rand mit Leitungswasser gefüllt, eine Petrischale über den Rand des Glases gestülpt und fest aufgedrückt. Dann wurde das Glas gedreht und mit der Öffnung nach unten abgestellt. Der Raum zwischen Petrischale und Glas wurde anschließend bis zum Rand mit Leitungswasser gefüllt und über Nacht stehen gelassen. Während dieser Zeit wanderten die Larven in das Wasser aus. Im nächsten Schritt wurde das Wasser zwischen Glas und Petrischale in ein Becherglas (DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland) gegossen. Die Petrischale wurde mit Leitungswasser gut nachgespült und der Rest der Larven ebenfalls in das Becherglas gegossen. Die auf

diese Weise gesammelten Larven wurden mit Hilfe eines Glas-Baermann-Trichters (DURAN Group GmbH, Mainz, Deutschland) von Kotresten gereinigt. Das hierzu verwendete Sieb bestand aus einer Lage Verbandsmull (Rauscher, Pattensen, Deutschland), zwei Lagen Zellstoff (WDT, Hannover, Deutschland) und einer weiteren Lage Mull. Der Schlauch am Ende des Trichters wurde mit einer Klemme versehen und zunächst deren Dichtigkeit mit Auffüllen von Leitungswasser in den Trichter getestet. War dieser Test erfolgreich, wurde das Leitungswasser wieder abgelassen und der Trichter mit der Larvensuspension aufgefüllt, bis diese das Sieb benetzte. Diese Apparatur wurde über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen wurde die Larvensuspension dann in eine Plastikdose (50 ml) mit Schraubverschluss (Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt und weiter im Kühlschrank gelagert.

3.2.17.3. Aufbewahrung in der Klinik

Die Helminthenstadien befanden sich für den Transport in Plastikröhrchen mit Leitungswasser. In der Medizinischen Kleintierklinik wurden die Röhrchen liegend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die embryonierten Eier von *T. vulpis* wurden zusätzlich einmal wöchentlich belüftet. Auf diese Weise waren die embryonierten Eier bis zum Abschluss des Versuches lagerfähig. Die L3 von *U. stenocephala* konnten im Kühlschrank zwei bis drei Wochen gelagert werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden neue L3 vom Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover übersandt.

3.2.18. Kotuntersuchungen im Flotationsverfahren

Alle Sammelkotproben der Hunde wurden einmal monatlich zu den Kontrollterminen mit Hilfe eines Flotationsverfahrens auf das Vorkommen von Endoparasiten, im Speziellen auf das Vorkommen von *T. vulpis* und *U. stenocephala*, untersucht. Dies geschah im Labor der Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Dort wurde die Untersuchung mit Hilfe des kommerziellen Parasiten-Diagnose-Systems der Firma Janssen (Janssen Animal Health, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) vom Laborpersonal durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Komplett-Set zur *In-vitro*-Untersuchung von Kotproben auf Parasiteneier und Oozysten im Flotationsverfahren. Als Flotationsmedium dient 29,5%iges Natriumnitrat. Die Funktion beruht auf dem Prinzip, dass bei Suspension von Kotproben in einer Lösung mit einem spezifischen Gewicht

von 1,2, Eier von Nematoden (Rundwürmer), denen *Trichuris* und *Uncinaria* angehören, nach oben flotieren, während sich die meisten schweren Kotbestandteile unten auf dem Grund eines Gefäßes absetzen. Die so an der Oberfläche der Flüssigkeit angereicherten Parasiteneier haften dann an einem aufgelegten Deckglas.

Hierfür wurde zunächst zu der in einem Sammelbehälter befindlichen Kotprobe Flotationslösung (Natriumnitrat und andere inerte Bestandteile) gegeben, bis der Behälter halb gefüllt war. Die Kotprobe und die Lösung wurden gründlich mit einem Einmal-Holzstäbchen durchmischt und ein Spezial-Diagnose-Filter in den Sammelbehälter eingefügt. Anschließend wurde so viel Flotationslösung aufgefüllt, bis sich ein konvexer Meniskus am inneren oberen Filterrand gebildet hatte. Auf diesen wurde ein Deckglas (22 x 22 mm) (Spicker Laborbedarf GmbH, Schwandorf, Deutschland) aufgelegt und das Gemisch wurde für 15 Minuten stehen gelassen. Die Wurmeier flotierten in dieser Zeit und blieben am Deckglas hängen. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Deckglas dann abgenommen und auf einen Objektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland) verbracht. Die Probe wurde mikroskopisch bei geringem Licht und maximal 100facher Vergrößerung untersucht. Dieses Verfahren wird standardmäßig im Labor der Medizinischen Kleintierklinik verwendet.

3.2.19. Statistik

Um die Juckreiz- und CADESI-Werte am Anfang und Ende des Versuches innerhalb der Patientengruppen zu vergleichen, wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test benutzt. Die Auswertung erfolgte mittels einer „Intention to treat“-Analyse, bei der bei Hunden, die aus der Studie ausgeschlossen wurden, die letzten gemessenen Werte bis zum Ende der Studie fortgeschrieben und statistisch ausgewertet wurden. Zum statistischen Vergleich der Zellen (Mastzellen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten) pro Fläche in den histologischen Präparaten am Anfang und am Ende des Versuches wurde ebenfalls der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Derselbe statistische Test wurde dafür benutzt, den Einfluss der Helminthengabe auf die Zytokinexpression zu vergleichen. Ein P-Wert unter 0,05 wurde hierbei als signifikant angesehen. Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen Graphpad Prism 5.0 und InStat 3.06 (Graphpad Software, San Diego, USA) erstellt.

IV. Ergebnisse

4.1. Hunde

Es wurden insgesamt zwölf Hunde in den Versuch eingeschlossen. Diese wurden mittels Randomisierungstafeln anfänglich in vier Behandlungsgruppen zu je drei Hunden eingeteilt. Ein Hund wurde aufgrund von Nebenwirkungen (Durchfall und Erbrechen) vorzeitig aus der Studie genommen, seine letzten Werte jedoch weitergeschrieben und in einer „Intention to treat“-Analyse in die statistische Auswertung eingeschlossen.

4.1.1. Altersverteilung

Das Alter der Hunde variierte bei Studienbeginn zwischen zwei und 13 Jahren. Der Altersdurchschnitt lag bei 5,8 Jahren (Median 5,5).

4.1.2. Geschlechtsverteilung

Die Mehrheit der Hunde, die in den Versuch eingeschlossen wurden, war männlich (8/12). Zwei der männlichen und drei der weiblichen Tiere waren kastriert.

4.1.3. Rassenverteilung

Die an der Studie teilnehmenden Hunde gehörten neun verschiedenen Hunderassen an. Außerdem waren zwei Mischlingshunde dabei (Tabelle 4).

Rasse	Anzahl der Hunde
Mischlingshunde	2
Boxer	1
Cairn Terrier	1
Deutscher Wachtelhund	1
Golden Retriever	2
Gordon Setter	1
Mittelspitz	1
Rhodesian Ridgeback	1
Schäferhund	1
West Highland White Terrier	1

Tabelle 4: Rassen der untersuchten Hunde sowie deren jeweilige Anzahl.

4.2. Untersuchungsdaten

Im Rahmen des Versuches wurden die Hautläsionen der Hunde bezüglich des Schweregrades der Veränderungen mit Hilfe eines CADESI, der aktuelle Juckreiz anhand einer visuellen Analogskala und der Gesamtzustand der Haut mittels einer allgemeinen Beurteilung bewertet.

4.2.1. CADESI

An den Tagen 0, 30, 60 und 90 wurde der Schweregrad der Läsionen durch die atopische Dermatitis für jeden Hund anhand eines CADESI ermittelt. Alle atopischen Hunde zeigten am Ende der Studie eine Reduktion der CADESI-Werte, unabhängig davon, welcher Behandlungsgruppe sie angehörten. Dies ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	CADESI vorher	CADESI nachher
Mittelwert	93	25
Konfidenzintervall	44 – 143	13 – 37
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		0,0005

Tabelle 5: CADESI von Hunden mit atopischer Dermatitis am Anfang (vorher) und am Ende der Studie (nachher).

Bei Hunden, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, verbesserte sich der CADESI-Wert signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $P = 0,0313$) (Abbildung 10). Ebenso verhielt es sich bei der Behandlungsgruppe, die L3 von *U. stenocephala* erhalten hatte. Auch hier kam es zu einer signifikanten Reduktion der Punktwerte der CADESI (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $P = 0,0313$) (Abbildung 11).

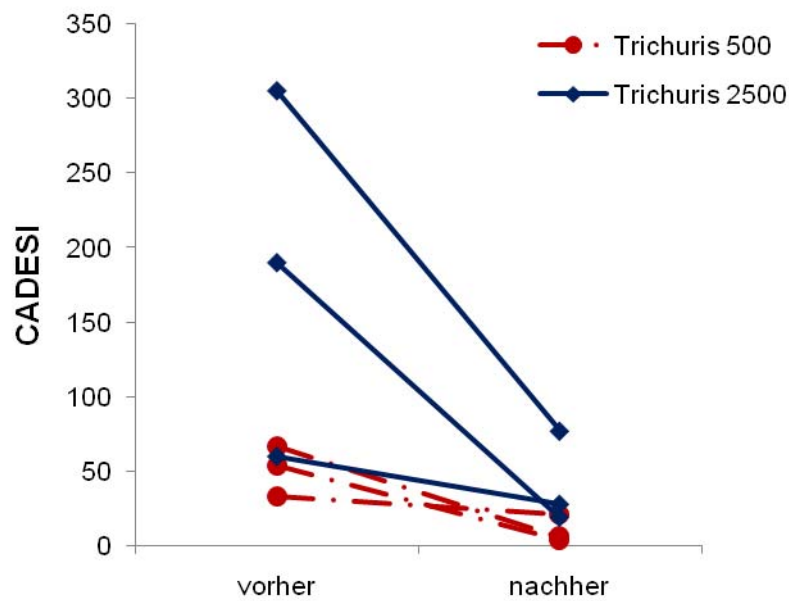


Abbildung 10: CADESI der atopischen Hunde, die 500 oder 2500 embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige CADESI-Wert angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.

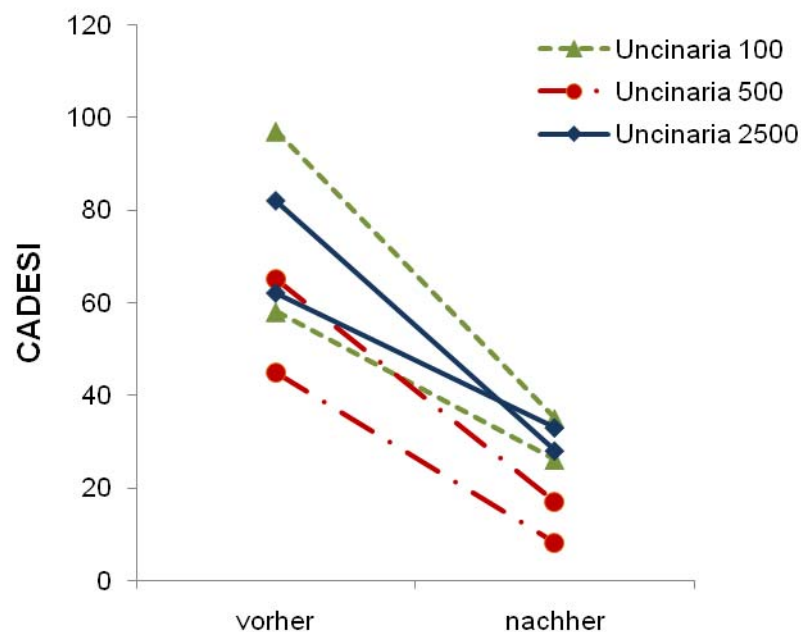


Abbildung 11: CADESI der atopischen Hunde, die 100, 500 oder 2500 L3 von *U. stenocephala* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige CADESI-Wert angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.

Bei zehn von zwölf Hunden (83 %) waren die Punktwerte des CADESI zum Ende der Studie um mehr als 50 % vermindert. Dabei gehörten jeweils fünf Hunde einer der *Uncinaria*-Behandlungsgruppen an und weitere fünf den *Trichuris*-Behandlungsgruppen. Bei drei der genannten zehn Hunde reduzierte sich der CADESI-Wert sogar um 90 % oder mehr. Diese letztgenannten drei Hunde befanden sich in den Behandlungsgruppen mit *T. vulpis*.

4.2.2. Juckreiz

Die Besitzer beurteilten den jeweils aktuellen Juckreiz ihres Hundes beim ersten Studientermin sowie im Rahmen jeder weiteren Kontrolle anhand einer visuellen Analogskala von 0 – 10. Das linke Ende dieser Skala stand für den Wert Null und somit einen Hund der keinerlei Juckreiz zeigt. Das rechte Ende entsprach einem Wert von Zehn. Darunter konnte man sich einen Hund vorstellen, der unter extremem Juckreiz leidet und sich ständig kratzt. Fasste man die Werte aller Hunde, unabhängig welcher Behandlungsgruppe sie zugehörig waren, zusammen, so zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion des Juckreizes am Ende im Vergleich zum Beginn der Studie. Eine Darstellung findet sich in anschließender Tabelle:

	Juckreiz vorher	Juckreiz nachher
Mittelwert	4,7	2,7
Konfidenzintervall	3,2 – 6,2	1,2 – 4,2
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		0,0425

Tabelle 6: Werte der Juckreizskala von Hunden mit atopischer Dermatitis am Anfang (vorher) und am Ende des Versuches (nachher).

Betrachtete man die *Trichuris*- und *Uncinaria*-Gruppen für sich, so war die Abnahme des Juckreizes bei den Hunden, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, statistisch nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $P = 0,1563$) (Abbildung 12). Ähnlich verhielt es sich auch hier bei den Hunden, die L3 von *U. stenocephala* bekommen hatten. Der Rückgang des Juckreizes war statistisch nicht signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $P = 0,2188$) (Abbildung 13).

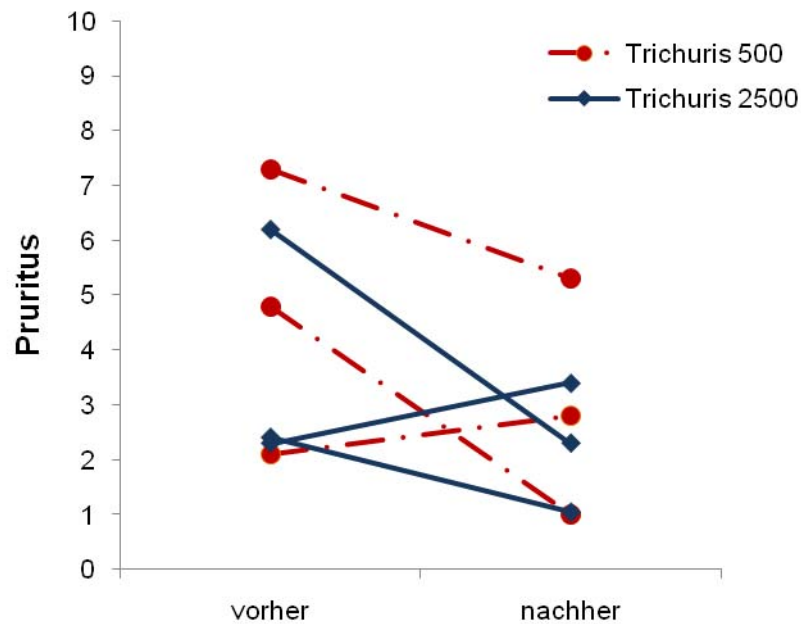


Abbildung 12: Juckreiz (Pruritus) der atopischen Hunde, die 500 oder 2500 embryonierete Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige Wert des Juckreizes angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.

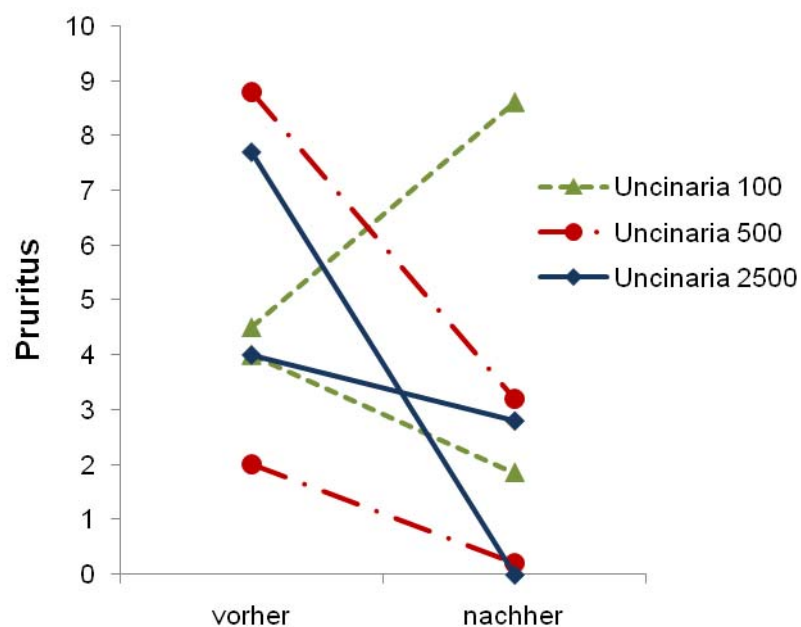


Abbildung 13: Juckreiz (Pruritus) der atopischen Hunde, die 100, 500 oder 2500 L3 von *U. stenocephala* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige Wert des Juckreizes angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.

Bei sieben von zwölf Hunden (58 %) verbesserte sich der Juckreiz auf der Skala um mehr als 50 %, bei einem Hund sogar um 100 %. Von den sieben genannten Hunden gehörten vier einer der Behandlungsgruppen an, die *Uncinaria* erhalten hatten, und drei einer der *Trichuris*-Gruppen. Bei drei von zwölf Hunden verschlechterte sich der Juckreiz auf der Skala. Diese drei hatten verschiedene Helminthen und unterschiedliche Dosen erhalten.

4.2.3. Allgemeine Beurteilungen der Haut

Die Besitzer beurteilten am Tag 0 und am Ende der Studie den aktuellen Zustand der Haut ihres Hundes. Es konnte zwischen den Begriffen exzellent, gut, ausreichend und ungenügend gewählt werden. Acht Hunde wurden am Ende der Studie von ihren Besitzern besser beurteilt als am Anfang der Studie, was aus folgender Tabelle hervorgeht:

<i>Trichuris vulpis</i> -Gruppe			<i>Uncinaria stenocephala</i> -Gruppe		
Hund Nr.	vorher	nachher	Hund Nr.	vorher	nachher
1	ungenügend	gut	1	gut	exzellent
2	ungenügend	ausreichend	2	ausreichend	gut
3	ausreichend	gut	3	ausreichend	gut
4	gut	exzellent	4	ausreichend	gut
5	gut	gut	5	ausreichend	ausreichend
6	ausreichend	ausreichend	6	exzellent	exzellent

Tabelle 7: Allgemeine Beurteilungen der Haut der an dem Versuch teilnehmenden Hunde am Anfang (vorher) und am Ende der Studie (nachher).

Von diesen acht Hunden gehörten jeweils vier der Gruppe an, die L3 von *U. stenocephala* erhalten hatte, und vier davon erhielten embryonierte Eier von *T. vulpis*. Keiner der Hunde verschlechterte sich in der Einschätzung seines Besitzers.

4.3. Etablierung der Primer für IL-10

4.3.1. Polymerasekettenreaktion und Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung, ob die Primer für IL-10 ein spezifisches Amplifikat bildeten, wurden sie zunächst in einer PCR mit der Hot FIREPol® Polymerase auf caniner cDNA getestet und anschließend das PCR-Produkt in einem 2%igen Agarosegel analysiert. Wie in der nachfolgenden Abbildung erkennbar ist, zeigte sich im Agarosegel nur eine distinkte Bande in der zu erwartenden Größe zwischen 100 und 150 bp. Es lag keine Kontamination vor.

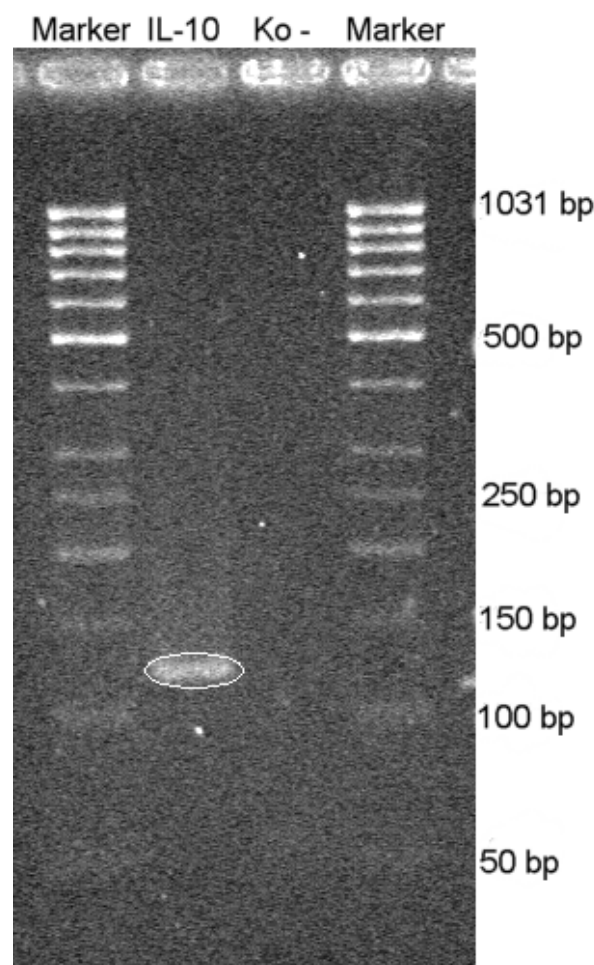


Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes der IL-10 Primer. Rechts und links außen ist der Marker aufgetragen. Links in der Mitte zeigt sich das PCR-Produkt (IL-10) als eine distinkte Bande im Gel (umkreist) mit einer Länge zwischen 100 und 150 Basenpaaren (bp). Rechts in der Mitte ist die Negativkontrolle (Ko -) aufgetragen worden, um Kontaminationen auszuschließen.

4.3.2. Ermittlung der Effizienz

Für die Effizienz des Primerpaares von IL-10 wurde durch die Erstellung einer Standardkurve in der qPCR ein Wert von 1,86 und ein Korrelationskoeffizient (R^2) von 0,9954 ermittelt (Abbildung 15). Ein Effizienz-Wert von 2,0 (zweifache Amplifizierung pro Zyklus) würde einer Effizienz von 100 % entsprechen.

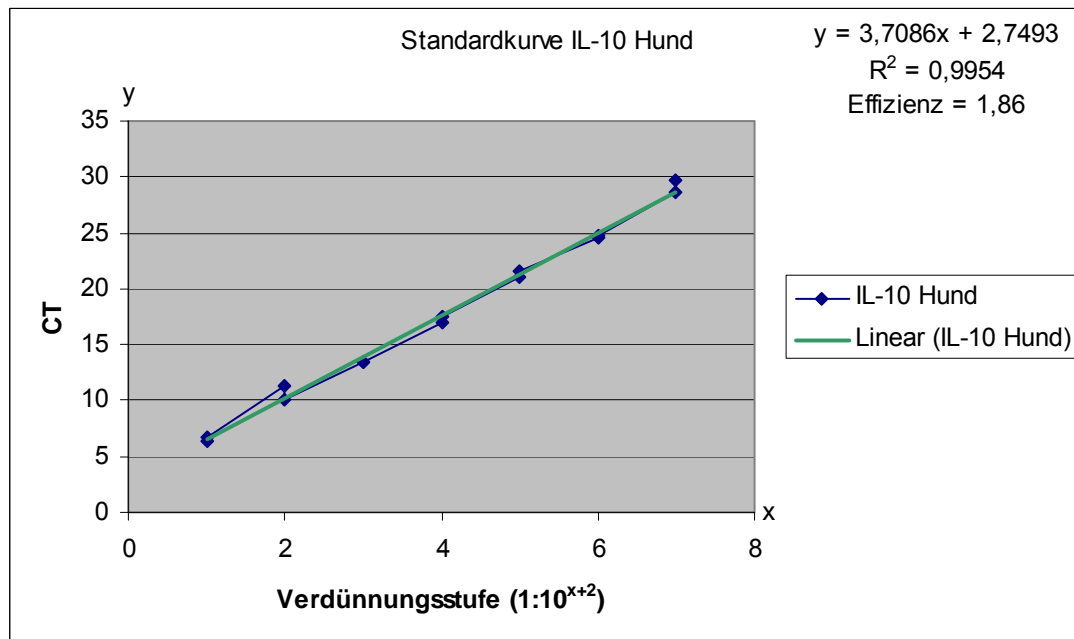


Abbildung 15: Ermittlung der Effizienz der IL-10 Primer anhand einer Standardkurve. Auf der y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen, auf der x-Achse die Verdünnungsstufe des log10-verdünnten PCR-Produktes. Es wurde die Geradengleichung $y = 3,7086x + 2,7493$ mit einem Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,9954$ errechnet. Für die Effizienz des Primerpaares von IL-10 wurde $E = 1,86$ ermittelt.

4.4. Quantitative Polymerasekettenreaktion

4.4.1. Auswertung der qPCR-Daten

Mit den am Ende der qPCR erhaltenen Ct-Werten konnte eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Dafür wurde der Mittelwert (MW) der Ct-Werte des Referenzgens (18S rRNA) vom Mittelwert der Ct-Werte des jeweiligen Zielgens (Gen X) desselben Gewebes abgezogen. Daraus resultierte der ΔCt -Wert (Abbildung 16). Je kleiner der ΔCt -Wert ist, umso größer ist die mRNA-Konzentration des Zielgens.

$$\Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} = MW (Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}}) - MW (Ct_{18S \text{ rRNA/Gewebe A}})$$

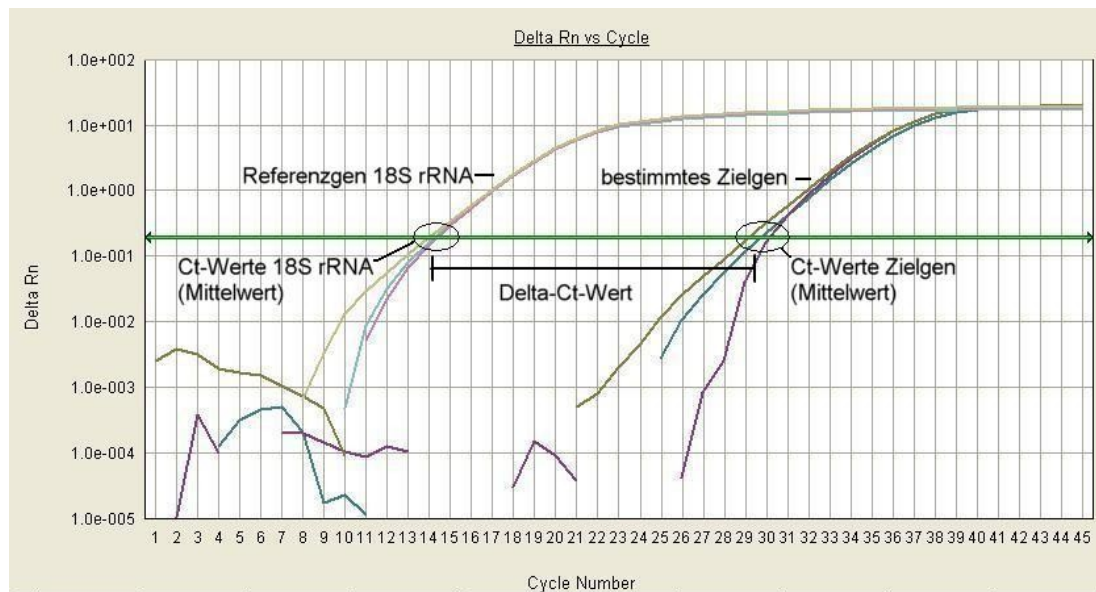


Abbildung 16: Aus den in Triplikaten pipettierten Proben wurde der Mittelwert der drei resultierenden Ct-Werte des Referenzgens (18S rRNA) und des jeweiligen Zielgens (IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β) desselben Gewebes bestimmt. Diese Mittelwerte wurden voneinander abgezogen, wodurch man den Delta (Δ)-Ct-Wert erhielt (Normalisierung).

Sobald die Daten der qPCR für Hautproben am Ende der Studie vorlagen, wurde der ΔCt -Wert des Referenzgewebes (Haut eines Hundes vor Helminthen-Therapie) vom ΔCt -Wert des mit diesem zu vergleichenden Gewebes (Haut des jeweils selben Hundes nach Helminthen-Therapie, im Folgenden Gewebe A) abgezogen (Kalibrierung). Dadurch erhielt man den $\Delta\Delta Ct$ -Wert.

$$\Delta\Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} = \Delta Ct_{\text{Gen X/Gewebe A}} - \Delta Ct_{\text{Gen X/Referenzgewebe}}$$

Mit Hilfe des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes und der Effizienz E des für das bestimmte Gen (Zytokin) spezifischen Primerpaares ließ sich die Zytokinexpression nach folgender Formel errechnen:

$$n\text{-fache Expression (Probe nach der Therapie mit Helminthen im Vergleich zur Probe vor der Therapie mit Helminthen)} = E (\text{Effizienz})^{-\Delta\Delta Ct}$$

4.4.2. Resultate der Zytokinexpression

Für diese Studie wurde die Zytokinexpression von IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β in Hautstanzen atopischer Hunde drei Monate nach der Verabreichung der Helminthen mit der Expression am Tag 0 verglichen. Es konnte weder IFN- γ mRNA noch IL-4 mRNA bzw. deren cDNA-Kopien mit Hilfe der qPCR in Hautstanzen von atopischen Hunden detektiert werden (s. hierzu auch 4.5. Positivkontrolle der Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA). TGF- β und IL-10 konnten in allen 24 Proben (je zwei Proben von zwölf Hunden) gemessen werden. Allerdings waren die Änderungen der Zytokinexpression am Ende der Studie sehr variabel und statistisch nicht signifikant.

4.4.2.1. TGF- β

TGF- β wurde von sieben Hunden am Ende der Studie höher exprimiert als am Anfang. Von diesen sieben Hunden gehörten vier der Gruppe an, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatte, und drei der Gruppe, die L3 von *U. stenocephala* erhalten hatte. Fünf Hunde zeigten am Ende des Versuches eine erniedrigte Expression von TGF- β . Die durchschnittliche Erhöhung war statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Hd. Nr.	Helminthen Dosis am Tag 0	n-fache TGF- β Expression am Ende der Studie	Expressions-Mittelwerte der Behandlungsgruppen
1	2500 embryonierte Eier von <i>T. vulpis</i>	1,27	1,17
2		0,32	
3		1,93	
4	500 embryonierte Eier von <i>T. vulpis</i>	0,38	1,81
5		3,91	
6		1,15	
7	2500 L3 von <i>U. stenocephala</i>	0,51	0,46
8		0,41	
9	500 L3 von <i>U. stenocephala</i>	0,74	1,17
10		1,59	
11	100 L3 von <i>U. stenocephala</i>	1,73	1,65
12		1,57	
Statistische Signifikanz			nicht signifikant

Tabelle 8: n-fache TGF- β Expression der zwölf atopischen Patienten am Ende im Vergleich zum Anfang der Studie und deren Zugehörigkeit zu einer der Behandlungsgruppen. Ein Wert von 1 für die Expression entspricht einer unveränderten Expression im Vergleich zum Studienbeginn.

4.4.2.2.IL-10

Die Hälfte der Patienten zeigte am Ende der Studie eine gesteigerte Expression von IL-10 im Vergleich zum Anfang. Fünf dieser sechs Hunde gehörten zu der Gruppe, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatte, einer zu der Gruppe, die L3 von *U. stenocephala* erhalten hatte. Die verbleibenden sechs atopischen Hunde exprimierten IL-10 am Ende des Versuches niedriger als am Anfang. Die Veränderungen waren statistisch nicht signifikant. Zur Veranschaulichung der Resultate sind sie in der anschließenden Tabelle aufgeführt:

Hd. Nr.	Helminthen Dosis am Tag 0	n-fache IL-10 Expression am Ende der Studie	Expressions-Mittelwerte der Behandlungsgruppen
1	2500 embryonierte Eier von <i>T. vulpis</i>	5,06	3,37
2		1,55	
3		3,51	
4	500 embryonierte Eier von <i>T. vulpis</i>	2,59	4,74
5		11,03	
6		0,61	
7	2500 L3 von <i>U. stenocephala</i>	0,97	0,92
8		0,86	
9	500 L3 von <i>U. stenocephala</i>	0,75	2,14
10		3,52	
11	100 L3 von <i>U. stenocephala</i>	0,54	0,48
12		0,42	
Statistische Signifikanz			nicht signifikant

Tabelle 9: n-fache IL-10 Expression der zwölf atopischen Patienten am Ende im Vergleich zum Anfang der Studie und deren Zugehörigkeit zu einer der Behandlungsgruppen. Ein Wert von 1 für die Expression entspricht einer unveränderten Expression im Vergleich zum Studienbeginn.

4.5. Positivkontrolle der Primer für IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β und 18S rRNA

Da während der Studie weder IFN- γ mRNA noch IL-4 mRNA bzw. deren cDNA-Kopien in der qPCR detektiert werden konnten, wurde eine Positivkontrolle für die Zytokine IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β sowie für das Referenzgen 18S rRNA generiert. Damit sollte gezeigt werden, dass sowohl die Primer reproduzierbar funktionieren als auch, dass die gewählte Methode (qPCR) genügend sensitiv ist, die genannten Zytokine zu detektieren.

Als Positivkontrolle wurde canine cDNA von mit Con A stimulierten PBL gewählt, da diese die genannten Zytokine in ausreichender Menge exprimieren. Diese cDNA wurde mit den entsprechenden Primern als Matrize in der qPCR eingesetzt. Die Proben wurden in Triplikaten pipettiert. Es zeigte sich, dass alle Zytokine in der Positivkontrolle detektierbar waren. In der folgenden Abbildung sind die Amplifikationskurven der Positivkontrolle dargestellt.

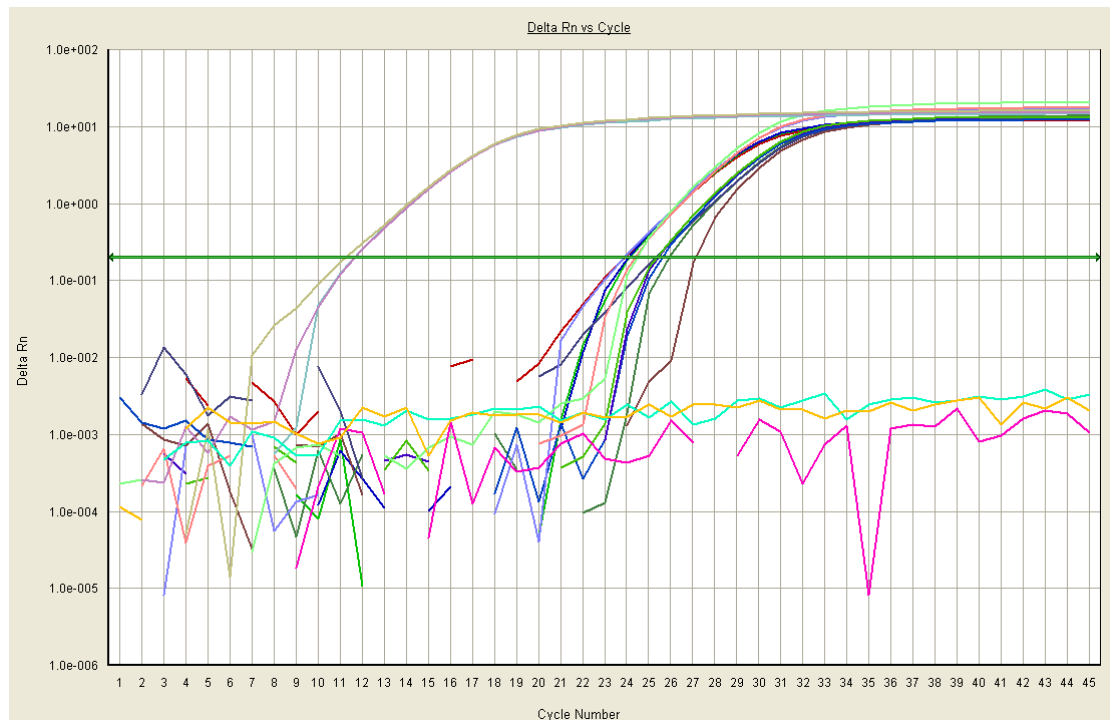


Abbildung 17: Amplifikationskurven der Positivkontrolle mit der caninen cDNA von stimulierten PBL. Es waren für alle Zytokine je drei Amplifikationskurven nachweisbar (Triplikate).

In der nachfolgenden Tabelle sind die gefundenen Ct-Mittelwerte aufgeführt. Die Kontrollansätze ohne cDNA (Negativkontrollen) lieferten keine Ct-Werte. Eine Kontamination konnte somit ausgeschlossen werden.

Gen	Ct-Mittelwerte der in Triplikaten pipettierten Proben
IL-4	24,01
IL-10	26,06
TGF- β	25,36
IFN- γ	24,15
18S rRNA	11,45
Negativkontrollen	kein Wert

Tabelle 10: Ct-Mittelwerte der Triplikate der Positivkontrolle für die Primer von IL-4, IL-10, TGF- β , IFN- γ und 18S rRNA. Eine Kontamination konnte anhand der Negativkontrollen, die keine Ct-Werte erbrachten, ausgeschlossen werden.

Anhand dieser Positivkontrolle konnte gezeigt werden, dass die zu untersuchenden Zytokine in der qPCR messbar sind und es daher nicht an der Methode lag, dass die mRNA von IL-4 und IFN- γ nicht detektierbar war.

4.6. Kontrolle der RNA in der Agarosegelelektrophorese

Die aus den Hautstanzen von Hunden extrahierte Gesamt-RNA wurde am Anfang der Studie zur Überprüfung ihrer Qualität elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Wie in anschließender Abbildung gezeigt, waren bei der isolierten RNA die Banden für die 28S und 18S rRNA deutlich nachzuweisen.

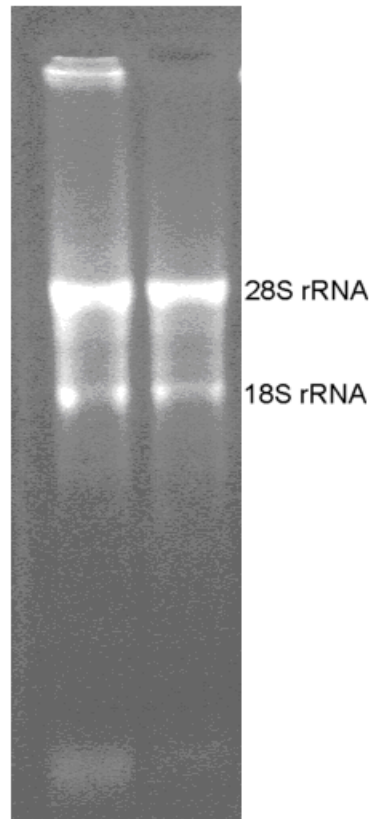


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese isolierter Gesamt-RNA. Die im Gel dargestellten Banden liegen im Bereich von 18S und 28S rRNA.

4.7. Detektion möglicher Inhibitoren im RNA-Extrakt

Zum Ausschluss von Inhibitoren im aus den Hautproben isolierten RNA-Extrakt, die die cDNA-Synthese blockieren können, wurde eine mit der TrifastTM-Methode extrahierte RNA zusätzlich mit Natriumacetat gefällt. Im Anschluss wurde sie in cDNA umgeschrieben und als Matrize in der qPCR mit den 18S rRNA Primern eingesetzt. Die zusätzlich mit Natriumacetat gefällte RNA sollte mit der durch die TrifastTM-Methode isolierten RNA verglichen werden. Hierzu wurden die ermittelten Ct-Werte herangezogen. Wie sich bereits im Bild der Amplifikationskurven zeigte (Abbildung 19), lagen die Ct-Werte der beiden Proben dicht aneinander.

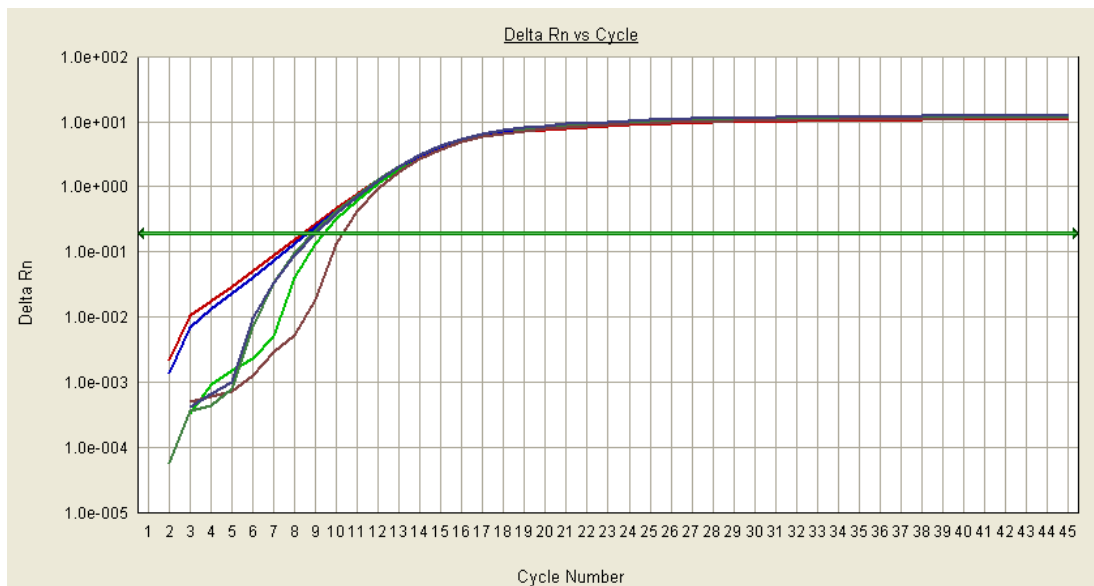


Abbildung 19: Amplifikationskurven für 18S rRNA in der qPCR der mit Natriumacetat gefällten Probe und der nur mit der TrifastTM-Methode gewonnenen Probe. Die Ct-Werte liegen dicht beieinander.

Folgende Ct-Mittelwerte wurden anhand der Ergebnisse der qPCR für die in Triplikaten pipettierten Proben ermittelt:

Probe	Gen	Ct-Mittelwert
mit Trifast TM isolierte RNA	18S rRNA	8,78
zusätzlich mit Natriumacetat gefällte RNA	18S rRNA	9,37

Tabelle 11: Ct-Mittelwerte der unterschiedlich gefällten RNA-Proben.

Für die mit TrifastTM isolierte RNA ergab sich ein Mittelwert der Ct-Werte von 8,78, für die zusätzlich mit Natriumacetat gefällte RNA ein Mittelwert von 9,37. Die Differenz zwischen beiden Mittelwerten machte weniger als einen Ct-Wert aus und stellte somit keinen bedeutenden Unterschied dar, der erklären könnte, weshalb keine mRNA von IL-4 und IFN- γ in den Hautproben der Hunde nachweisbar war. Somit konnte auch ausgeschlossen werden, dass die cDNA-Synthese von IL-4 und IFN- γ durch Inhibitoren im RNA-Extrakt blockiert wurde und die mRNA dieser beiden Gene deshalb nicht nachweisbar war. Die RNA konnte im Versuch weiterhin mit der TrifastTM-Methode isoliert werden.

4.8. Histologische Auswertung

4.8.1. Mastzellen

Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte für die Mastzellen in der Giemsa-Färbung. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Vorkommens an Mastzellen in den Schnitten zum Beginn der Studie (vorher) im Vergleich zum Ende der Studie (nachher) festgestellt werden. Die Ergebnisse der Auswertung sind in folgender Tabelle dargestellt:

	Mastzellen vorher	Mastzellen nachher
Anzahl der ausgewerteten Schnitte	12	12
Mittlere Zellzahl pro mm ²	0,1946	0,1379
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		P = 0,5186
Statistische Signifikanz		nicht signifikant

Tabelle 12: Auswertung der Mastzellen in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.

4.8.2. Neutrophile Granulozyten

Die Auszählung der neutrophilen Granulozyten wurde in der Luna-Färbung vollzogen. Es konnte keine signifikante Veränderung des Infiltrats hinsichtlich dieser Zellen zum Ende der Studie bemerkt werden. Die Resultate der Auswertung finden sich in der anschließenden Tabelle:

	neutrophile Granulozyten vorher	neutrophile Granulozyten nachher
Anzahl der ausgewerteten Schnitte	12	12
Mittlere Zellzahl pro mm ²	0,0123	0,0175
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		P = 0,4238
Statistische Signifikanz		nicht signifikant

Tabelle 13: Auswertung der neutrophilen Granulozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.

4.8.3. Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten wurden in nach Luna gefärbten Präparaten gezählt. Für diese Zellen konnte keine signifikante Veränderung des Infiltrats am Ende der Studie festgestellt werden. Die Auswertung lieferte die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Ergebnisse:

	eosinophile Granulozyten vorher	eosinophile Granulozyten nachher
Anzahl der ausgewerteten Schnitte	12	12
Mittlere Zellzahl pro mm ²	0,0173	0,0072
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		0,8438
Statistische Signifikanz		nicht signifikant

Tabelle 14: Auswertung der eosinophilen Granulozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.

4.8.4. Lymphozyten

4.8.4.1.Luna-Färbung

Die Auswertung der Lymphozyten erfolgte in Luna-gefärbten histologischen Schnitten. In diesen Schnitten brachte die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied im Infiltrat zwischen dem Anfang und dem Ende der Studie. Dies ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

	Lymphozyten vorher	Lymphozyten nachher
Anzahl der ausgewerteten Schnitte	12	12
Mittlere Zellzahl pro mm ²	0,2137	0,1763
P-Wert (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)		0,4238
Statistische Signifikanz		nicht signifikant

Tabelle 15: Auswertung der Lymphozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.

4.8.4.2.Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung mit Hilfe eines polyklonalen CD3-Antikörpers erwiesen sich die Hautstanzen atopischer Hunde mit einem Durchmesser von vier Millimetern als nicht geeignet. Das Gewebestückchen war zu klein und zerbrach bei der Vorbereitung in winzige Anteile, was eine Auswertung nicht zuließ. Sowohl die Behandlung in der Mikrowelle als auch eine alternativ dazu durchgeführte Behandlung im Wasserbad führte zu den gleichen, unbefriedigenden Resultaten.

4.9. Kotuntersuchungen

In keiner der Kotuntersuchungen während der Studie konnten Eier von *T. vulpis* nachgewiesen werden. Eier von *U. stenocephala* wurden dagegen regelmäßig gefunden. Die Ergebnisse der Kotuntersuchungen sind in folgenden Tabellen dargestellt:

Trichuris vulpis-Gruppe

Hund Nr.	Kot Tag 0	Kot Tag 30	Kot Tag 60	Kot Tag 90
1	negativ	negativ	negativ	negativ
2	negativ	negativ	negativ	negativ
3	negativ	negativ	negativ	negativ
4	negativ	negativ	negativ	negativ
5	negativ	negativ	negativ	negativ
6	negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 16: Befunde der Kotuntersuchungen der atopischen Hunde, die am Tag 0 (Beginn der Studie) embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten.

Uncinaria stenocephala-Gruppe

Hund Nr.	Kot Tag 0	Kot Tag 30	Kot Tag 60	Kot Tag 90
1	negativ	negativ	positiv	positiv
2	negativ	positiv	positiv	positiv
3	negativ	positiv		
4	negativ	positiv	positiv	positiv
5	negativ	positiv	positiv	positiv
6	negativ	positiv	positiv	positiv

Tabelle 17: Ergebnisse der Kotuntersuchungen der atopischen Hunde, die am Tag 0 L3 von *U. stenocephala* erhalten hatten. Hund Nr. 3 wurde wegen Nebenwirkungen auf Wunsch des Besitzers an Tag 30 aus der Studie herausgenommen.

V. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Studie

Zwölf Hunde mit atopischer Dermatitis wurden in die vorliegende Studie eingeschlossen, um herauszufinden, ob die Verabreichung von embryonierten Eiern von *T. vulpis* oder L3 von *U. stenocephala* zu einer Veränderung der klinischen Symptome oder der kutanen Zytokinexpression und des kutanen zellulären entzündlichen Infiltrats führt. Am Anfang und am Ende der Studie wurden Hautstanzen der Hunde genommen und histologische Präparate angefertigt sowie die Zytokinexpression mittels qPCR gemessen. Außerdem erfolgte eine allgemeine Beurteilung des Hautzustandes der Hunde durch den Besitzer. Zu den monatlichen Kontrollterminen wurden die Läsionen der caninen atopischen Dermatitis anhand eines CADESI und der Juckreiz mit Hilfe einer visuellen Analogskala beurteilt. Außerdem wurde monatlich eine Kotprobe auf das Vorkommen von Eiern von *T. vulpis* oder *U. stenocephala* untersucht.

Die Verabreichung der Helminthen führte bei den atopischen Hunden zu einer signifikanten Reduktion der CADESI-Werte sowie des Juckreizes, wenn man alle Hunde zusammen gruppierte. Der CADESI ist ein in der Veterinärdermatologie weithin akzeptierter und erst kürzlich validierter Punktwert für die Beurteilung von Läsionen, die durch die atopische Dermatitis verursacht werden (OLIVRY *et al.* 2007, OLIVRY *et al.* 2008). Betrachtete man die *Trichuris*- und *Uncinaria*-Gruppe für sich, so kam es nur bei den CADESI-Werten zu einer signifikanten Reduktion, nicht jedoch beim Juckreiz. Es kam in diesem Versuch zu keiner konsistenten oder signifikanten Beeinflussung der Expression von TGF- β und IL-10. In keiner der Proben konnte mittels qPCR IL-4 mRNA oder IFN- γ mRNA bzw. deren cDNA-Kopien detektiert werden. Auch das zelluläre entzündliche Infiltrat veränderte sich, gemessen anhand der Zahl der Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten, nicht signifikant. In keiner der Kotproben der atopischen Hunde, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, konnte dieser Helminth nachgewiesen werden.

Dem vorliegenden Versuch sind einige Grenzen gesetzt. Aufgrund der vergleichsweise geringen Probenanzahl müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Da es sich um eine Orientierungsstudie handelte, wurden den atopischen Hunden zwei verschiedene Helminthen in jeweils zwei verschiedenen Dosen verab-

reicht. Dabei bestand jede Gruppe nur aus drei Hunden. Außerdem musste die Dosis der L3 von *U. stenocephala* bei den letzten zwei Hunden aufgrund von Nebenwirkungen bei den anderen Hunden dieser Gruppe reduziert werden, so dass drei Gruppen mit jeweils zwei Hunden resultierten. Es ist nicht möglich, anhand dieser kleinen Gruppen eine aussagekräftige Statistik zu vollziehen. Daher wurden die Tiere zusammengefasst. Hinzu kommt, dass dies eine „Proof of concept“-Studie war und keine Placebo-kontrollierte Gruppe in den Versuch eingeschlossen wurde. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit müssen durch doppelt-geblindete, Placebo-kontrollierte Studien bestätigt werden.

5.2. Einfluss von Helminthen auf die Klinik allergischer Krankheiten

Die erste Fragestellung dieser Studie war, ob die Verabreichung von Helminthen an atopische Hunde immunmodulierende Effekte besitzt und ob es zu einer Verbesserung der klinischen Symptome atopischer Dermatitis kommt. Es konnte eine signifikante Reduktion sowohl der Läsionen der atopischen Dermatitis anhand des CADESI-Wertes als auch des Juckreizes gezeigt werden. Außerdem schätzten die meisten Besitzer das Hautbild ihres Hundes am Ende der Studie besser ein als am Anfang.

Die „International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)“ machte einen auffallenden Unterschied hinsichtlich des Vorkommens von Asthma und allergischen Krankheiten zwischen Industrie- und Entwicklungsländern deutlich (ISAAC 1998). Helmintheninfektionen wurden negativ mit Atopie und der Prävalenz allergischer Krankheiten assoziiert. Chronische parasitäre Infektionen mildern Atopie bei Tieren wie auch beim Menschen. Humane Patienten, die mit Würmern infiziert sind, zeigen sowohl eine herabgesetzte T_H1 - als auch T_H2 -Immunantwort und gleichzeitig eine erhöhte Expression von IL-10 (CARVALHO *et al.* 2006). Einer polarisierten T_H2 -Immunantwort mit der Produktion der entsprechenden Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) wird bei der Fehlregulation des Immunsystems bei humaner atopischer Dermatitis größte Bedeutung zugemessen (KONING *et al.* 1997a, KONING *et al.* 1997b, VAN DER HEIJDEN *et al.* 1991, VAN REIJSEN *et al.* 1992). Basierend auf den in der Literaturübersicht genannten Forschungsergebnissen könnten Parasiten eine mögliche Therapie für immunbedingte Krankheiten darstellen. Aktuell laufen Versuche mit *T. suis* und *N. americanus* bei IBD und Asthma (FALCONE & PRITCHARD 2005). SUMMERS *et al.* (2003) behandelten vier Patienten mit Morbus Crohn und drei Patienten mit ulzerativer Kolitis mit einer

einmaligen oralen Dosis von 2500 *T. suis*-Eiern. Drei der vier Patienten mit Morbus Crohn und alle Patienten mit ulzerativer Kolitis gingen innerhalb von zwölf Wochen in Remission. Allerdings war dieser Effekt zeitlich begrenzt (SUMMERS *et al.* 2003).

Die Wahl der in diesem Versuch an atopische Hunde verabreichten Helminthenspezies und -dosen basierte auf den genannten humanmedizinischen Studien sowie einem Einzelfall von einem Hund mit schwerer, therapieresistenter atopischer Dermatitis, der auf eine Behandlung mit 2500 *T. vulpis*-Eiern ansprach. Durch den Einsatz artspezifischer Würmer wurde eine bessere Immunmodulation erhofft.

5.3. Nebenwirkungen beim Hund

Gleichzeitig erwartete man sich mit den gewählten Helminthen in den ausgesuchten Dosen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen bei den atopischen Hunden. *U. stenocephala* lebt im Dünndarm von Hunden. Dieser Parasit ernährt sich nicht von Blut, es kann aber Durchfall auftreten. Bei im Haushalt gehaltenen Tieren ist eine Infektion selten. *T. vulpis* parasitiert im Zäkum. Infektionen sind häufig asymptomatisch, gelegentlich kann es zu Durchfall kommen (JACOBS 1984). Aufgrund dieser Tatsachen sowie Erfahrungen mit Hundekolonien im Labor des Institutes für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden keine ernsthaften Nebenwirkungen bei den Hunden erwartet.

5.4. Zoonosegefahr

Die Embryonierung der Eier und damit die Entwicklung infektiöser Stadien geschieht bei *T. vulpis* sehr langsam (JACOBS 1984). Die Entwicklungszeit infektiöser Larven von *U. stenocephala* kann im Freien zwischen einer Woche bis hin zu fünf Monaten beanspruchen (WALKER & JACOBS 1981). Sowohl die Eier von *T. vulpis* als auch diejenigen von *U. stenocephala* sind damit nicht gleich nach der Ausscheidung mit dem Kot infektiös. Die Übertragung auf andere Haustiere oder den Menschen erscheint dadurch sehr unwahrscheinlich. Eine gute Hygienepaxis, zu der die Entfernung ausgeschiedenen Kotes gehört, minimiert das Infektionsrisiko erheblich.

Larven von *U. stenocephala* können beim Menschen in seltenen Fällen ein als *Larva migrans cutanea* bezeichnetes Krankheitsbild verursachen. Dabei handelt es sich um einen selbstlimitierenden Hautausschlag, der durch kutane Penetration der Larven entsteht (BLACKWELL & VEGA-LOPEZ 2001). Die Läsionen erscheinen als lineare, gerötete Plaques mit Bläschen, die stark jucken (RIVERA-ROIG *et al.*

2008). Die Infektion tritt häufiger in wärmeren Klimazonen (Afrika, Karibik, Südostasien) mit weniger guter Hygienepaxis auf (BLACKWELL & VEGA-LOPEZ 2001).

Infektionen mit *T. vulpis* sind beim Menschen sehr selten beschrieben. In einer Fallstudie zeigte eine Patientin unspezifische gastrointestinale Symptome. Im Kot der Patientin wurden Eier von *T. vulpis* nachgewiesen (DUNN *et al.* 2002). Anekdotische Daten berichten über eine viszerale *Larva migrans* (MASUDA *et al.* 1987, SAKANO *et al.* 1980).

Den Besitzern der an der vorliegenden Studie teilnehmenden Hunde wurde nahegelegt, allgemeine Hygienevorschriften (Hände waschen, kein Belecken des Gesichtes durch den Hund, Hundekot entfernen, Tierumgebung sauber halten) zu beachten sowie direkten Kontakt mit dem Kot des Hundes zu vermeiden. Dadurch wurde die bereits geringe Infektionsgefahr zusätzlich minimiert.

5.5. Einfluss von Helminthen auf die klinische Symptomatik von Hunden mit atopischer Dermatitis

Fasste man die Ergebnisse aller Hunde zusammen, so führte die Verabreichung der Helminthen bei den atopischen Hunden zu einer signifikanten Reduktion der CADESI-Werte sowie des Juckreizes. Selbst bei separater Betrachtung der *Trichuris*- und *Uncinaria*-Gruppe kam es bei den CADESI-Werten zu einer signifikanten Reduktion. Diese statistisch signifikante Verbesserung der Läsionen erhält aufgrund der vergleichsweise geringen Patientenzahl zusätzliche Bedeutung und scheint nicht zufällig zu sein, da alle Hunde eine Reduktion der CADESI-Werte zeigten. Basierend auf den in der Humanmedizin und bei anderen Spezies erzielten Forschungsergebnissen, könnte die Besserung der klinischen Symptomatik der caninen atopischen Dermatitis auf eine Modulation des Immunsystems durch die verabreichten Helminthen zurückzuführen sein. Antigene der Helminthen selbst oder von ihnen sezernierte immunmodulatorische Moleküle können dabei mit Zellen des Immunsystems des Wirtes interagieren. In dieser Studie konnte die Infektion mit *T. vulpis* im Gegensatz zu der mit *U. stenocephala* in Kotproben nicht nachgewiesen werden. Da es jedoch in beiden Behandlungsgruppen zu einer signifikanten Reduktion der Läsionen kam, könnte unter Umständen schon die Verabreichung der embryonierten Eier von *T. vulpis* eine Antigenwirkung gezeigt haben. Andererseits könnten auch noch andere Faktoren, wie beispielsweise eine veränderte Allergenkonzentration im Umfeld des Hundes, eine Rolle bei den klinischen Effekten gespielt haben.

Auch beim Juckreiz kam es zu einer signifikanten Reduktion bei den mit Helminthen behandelten Hunden, wenn man alle Hunde zusammen gruppierte. Die Beurteilung von Juckreiz ist subjektiv und häufig von Besitzer zu Besitzer unterschiedlich. Daher müssen diese Ergebnisse vorsichtiger interpretiert werden. Bei separater Bewertung der *Trichuris*- und *Uncinaria*-Behandlungsgruppe kam es hinsichtlich des Juckreizes zu keiner signifikanten Reduktion. Die drei Hunde, die am Ende der Studie verstärkten Juckreiz zeigten, hatten verschiedene Helminthen und unterschiedliche Dosen erhalten. Nur die Tiere, die hohe Dosen L3 (500 und 2500) von *U. stenocephala* erhalten hatten und bei denen Nebenwirkungen auftraten, zeigten eine einheitliche Reduktion des Juckreizes. Einerseits könnte die nicht signifikante Reduktion des Juckreizes in den jeweiligen Behandlungsgruppen an der geringen Fallzahl gelegen haben. Hinzu kommt, dass die Beurteilung des Juckreizes durch die Besitzer, wie bereits erwähnt, rein subjektiv war und ein objektiver Maßstab fehlte. Des Weiteren ist aus humanmedizinischen Studien bekannt, dass sowohl die Wurmbürde als auch die Chronizität der Infektion und die Helminthenspezies eine bedeutende Rolle spielen. Es könnte daher sein, dass die für diese Studie gewählten Helminthenspezies und -dosen ungeeignet waren, den Juckreiz zu beeinflussen oder, dass die Studiendauer von drei Monaten zu kurz war, um einen sichtbaren Effekt herbeizuführen. Andererseits ist es natürlich möglich, dass der Juckreiz durch die Verabreichung von Helminthen nicht beeinflusst wird. Dennoch kam es bei allen Hunden zusammen zu einer signifikanten Verbesserung des Juckreizes. Diese Besserung könnte, basierend auf aktuellen Forschungsergebnissen, durch eine Immunmodulation durch die Helminthen bedingt gewesen sein.

5.6. Einfluss von Helminthen auf die Zytokinexpression

Die Larven, Adulten und Eier von Helminthen besitzen eine Fülle an Antigenen. Als Antwort auf die andauernde Stimulation durch diese Antigene produziert das Immunsystem des Wirtes anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β . Dadurch soll das Gewebe des Wirtes vor Schäden durch die Parasiten bewahrt werden. Außerdem könnte dies vorhandene anti-allergische Effekte erklären (CARVALHO *et al.* 2006).

Um zu klären, ob ein immunmodulierender Effekt durch Helminthen bei Hunden mit atopischer Dermatitis mit einer Veränderung der kutanen Zytokinexpression einhergeht, wurde die qPCR für die Detektion der mRNA von IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β eingesetzt. IFN- γ und IL-4 wurden als repräsentative

Zytokine einer T_H1 - oder einer T_H2 -Immunantwort für die vorliegende Studie gewählt. IL-10 und TGF- β wurden ausgesucht, um den Einfluss von Helminthen auf T_{reg} -Zellen und die Expression dieser regulatorischen Zytokine zu untersuchen. Die mRNA von IL-10 und TGF- β bzw. deren cDNA-Kopien wurden in allen Proben der Studie detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, aus Hautstanzen von Hunden Gesamt-RNA von hoher Qualität zu isolieren. Nur RNA von guter und sehr guter Qualität wurde für die qPCR in cDNA umgeschrieben. Zu Beginn des Versuches wurden außerdem mögliche Inhibitoren im RNA-Extrakt, die mit der cDNA-Synthese interferieren könnten, ausgeschlossen. 50 % der atopischen Hunde, die Larven oder Eier von Helminthen erhalten hatten, zeigten am Ende des Versuchs eine erhöhte Expression von IL-10. 58 % der Tiere zeigten eine erhöhte Expression von TGF- β . Allerdings waren diese Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Dies mag zum einen an der geringen Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Hunde liegen, zum anderen an der hohen Standardabweichung. Es kann natürlich auch sein, dass die Expression dieser Zytokine tatsächlich nicht durch die Gabe von Helminthen beeinflusst wird. Die Ergebnisse der qPCR bieten nur eine Momentaufnahme der Genexprimierung. Bedingt durch einen dynamischen Zellstatus kommt es unvermeidlich zu einer natürlichen Variation der aus biologischen Proben isolierten RNA. Untersuchungen mittels qPCR, die sich auf aus komplexen Geweben wie der Haut extrahierte RNA stützen, erfassen Daten der unterschiedlichsten Zellen. Zelluläre Unterschiede hinsichtlich des Expressionsmusters von mRNA können durch diese Variabilität maskiert werden (BUSTIN *et al.* 2005). Bei Menschen mit atopischer Dermatitis konnte gezeigt werden, dass sich das Zytokinprofil mit Fortschreiten der Erkrankung verändert (LEUNG 2000, LEUNG & BIEBER 2003). Auch bei Hunden wurde postuliert, dass die Zytokinexpression abhängig von der Chronizität der Hautläsionen verläuft (MAEDA *et al.* 2002). In diesem dynamischen Geschehen werden die in dieser Studie untersuchten Zytokine nicht ständig, von allen Zellen und in konstanten Mengen exprimiert. Bei den an diesem Versuch beteiligten Hunden war die Erkrankung unterschiedlich weit fortgeschritten. Die Ergebnisse müssen aufgrund der geringen Probenzahl und der sehr variablen Ergebnisse der Zytokinexpression zwischen den Hunden mit Vorsicht interpretiert werden. Des Weiteren kann das Fehlen statistisch signifikanter Ergebnisse an den für diesen Versuch erwählten Helminthenspezies und -dosen oder am Zeitpunkt der Entnahme der Hautstanzen liegen. Andere Mechanismen, wie eine Änderung der Allergenkon-

zentration in der Umgebung, könnten auch für die bei den Patienten beobachteten klinischen Effekte verantwortlich gewesen sein.

In keiner einzigen Probe konnte IL-4 mRNA oder IFN- γ mRNA detektiert werden. Anhand einer Positivkontrolle konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Zytokine mit exakt den gleichen Methoden in stimulierten PBL gemessen werden konnten und es daher nicht an der Methode lag, dass IL-4 mRNA und IFN- γ mRNA nicht detektierbar waren. Bisher setzten Studien für die Bestimmung von Zytokin-mRNA aus läsionaler Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis nicht-quantitative (OLIVRY *et al.* 1999) und semi-quantitative Methoden (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b) ein. OLIVRY *et al.* (1999) nahmen bei Hunden mit atopischer Dermatitis sowie gesunden Kontrolltieren Hautbiopsien und fanden mittels RT-PCR sowohl in Proben atopischer als auch gesunder Haut IL-4 mRNA. IL-10 mRNA konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden. In fünf von 29 Proben konnte IFN- γ mRNA detektiert werden, aber vier dieser Proben stammten von dem einzigen Hund mit chronischen Läsionen (OLIVRY *et al.* 1999). NUTTALL *et al.* (2002) verglichen mit Hilfe semi-quantitativer RT-PCR die Expression von T_H1-, T_H2- und immunsuppressiven Zytokinen (mRNA) in läsionaler und nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde sowie in der Haut gesunder Hunde. Die Autoren berichteten über einen Anstieg von IL-4 bei caniner atopischer Dermatitis. IFN- γ mRNA wurde in läsionaler Haut vergleichsweise höher exprimiert als in nicht-läsionaler und gesunder Haut. Verglichen mit gesunder Haut war die Expression von TGF- β mRNA in atopischer Haut vermindert. Die Messung von IL-10 mRNA erbrachte sehr variable Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass frühe Stadien atopischer Dermatitis mit einer erhöhten Expression von IL-4 und einer verminderten Expression von TGF- β einhergehen (NUTTALL *et al.* 2002a, NUTTALL *et al.* 2002b). Im Gegensatz hierzu konnte in einem anderen Versuch unter dem Einsatz der hoch sensitiven qPCR mit TaqMan[®] Sonden nicht ein einziges Mal IL-4 mRNA in Hautproben von Hunden mit atopischer Dermatitis nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür war, dass die Zytokinexpression dynamisch abläuft, abhängig von der Chronizität der Hautläsionen. Die Expression von IFN- γ mRNA in läsionaler Haut war signifikant höher als in nicht-läsionaler oder gesunder Haut (MAEDA *et al.* 2002). Möglicherweise hat die weniger ausgeprägte chronische Entzündung der biopsierten Haut im Rahmen des vorliegenden Versuches zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt.

TAGLINGER *et al.* (2008) entnahmen Hautbiopsien bei allergischen sowie gesunden Katzen und ermittelten Unterschiede der Zytokinexpression in verschiedenen Körperbereichen der Tiere (TAGLINGER *et al.* 2008). Auch beim Hund könnte die Entnahmelokalisation der Hautstanzen eine Rolle spielen.

Für diese Studie wurde 18S rRNA als Referenzgen gewählt. In einer aktuellen Studie mit humanen Lymphozyten erwies sich 18S rRNA besonders geeignet als Referenzgen, da es im Vergleich zu anderen Referenzgenen am konstantesten exprimiert wurde. Es zeigte sich, dass die Normalisierung auf 18S rRNA die zuverlässigsten Ergebnisse lieferte (BAS *et al.* 2004). 18S rRNA wird von allen eukaryonten Zellen konstant exprimiert. Wenn man auf rRNA normalisiert, muss man jedoch bedenken, dass rRNA in viel höheren Mengen exprimiert wird als die Ziel-mRNA (BUSTIN 2000).

Die Detektion von mRNA mittels qPCR kann aufgrund verschiedener Punkte, beispielsweise zu geringer Mengen an cDNA-Matrize, der Anwesenheit von Inhibitoren der Polymerase-Aktivität bei der RT und PCR oder aufgrund der verwendeten Normalisierungsmethode schwierig sein. Isoliert man mRNA aus komplexen Geweben wie der Haut, so erbringen die Ergebnisse einer qPCR immer durchschnittliche Daten zahlreicher Zellen, unterschiedlicher Zelllinien und zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Aufgrund dessen müssen die quantitativen Ergebnisse kritisch beurteilt werden (BUSTIN *et al.* 2005). Das Zytokinprofil der T-Lymphozyten könnte durch zahlreiche andere Zellen der Epidermis und Dermis verwaschen worden sein, da die Zytokinexpression aus kompletten Hautbiopsien bestimmt wurde und keine aufbereiteten T-Zellen für den Versuch benutzt wurden. Außerdem könnte die Zytokinproduktion auch an anderer Stelle als läsionaler Haut stattfinden, beispielsweise in den Lymphknoten oder im peripheren Blut.

5.7. Beeinflussung des zellulären entzündlichen Infiltrats bei Atopie

In der vorliegenden Studie konnten nach der Verabreichung von Helminthen an atopische Hunde anhand der Anzahl der Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten keine signifikanten Veränderungen des zellulären entzündlichen Infiltrats in der Haut (oberflächliche und tiefe Dermis) festgestellt werden. Die mittlere Zellzahl pro mm² am Anfang der Studie war bei den Lymphozyten am größten und bei den neutrophilen Granulozyten am geringsten. Am Ende der Studie war ebenfalls die mittlere Zellzahl der Lymphozyten am höchsten, am

kleinsten jedoch die Zellzahl der eosinophilen Granulozyten. Dieser Befund deckt sich mit anderen Ergebnissen in der Literatur (OLIVRY *et al.* 1997).

Wie bei anderen Spezies finden sich Mastzellen in der Dermis von normaler Hundehaut. Jedoch werden histologisch an verschiedenen Körperregionen unterschiedliche Anzahlen von Mastzellen gesehen. AUXILIA und HILL (2000) beobachteten die größten Mengen Mastzellen in der medialen und lateralen Pinna sowie in der ventralen interdigitalen Haut der Vorder- und Hinterpfoten (AUXILIA & HILL 2000). Es existieren widersprüchliche Meinungen in der Literatur darüber, ob die Zahl kutaner Mastzellen bei caniner atopischer Dermatitis erhöht ist (HILL & OLIVRY 2001). SCOTT (1981) nahm bei 100 Hunden mit diagnostizierter Atopie Hautbiopsien. In den histopathologischen Präparaten zeigten sich erhöhte, verminderte oder normale Anzahlen an Mastzellen (SCOTT 1981). WILKIE *et al.* (1990) verglichen die zelluläre Morphologie der Haut atopischer und gesunder Hunde anhand dreier Körperareale (lateralen Hals, dorsaler Rumpf, kraniolaterales Abdomen). Sie konnten zeigen, dass die durchschnittliche Zahl an Mastzellen bei Hunden mit atopischer Dermatitis erhöht ist (WILKIE *et al.* 1990). In dem vorliegenden Versuch nahm die mittlere Zellzahl pro mm² von Mastzellen drei Monate nach Verabreichung der Helminthen an atopische Hunde ab, allerdings war diese Reduktion statistisch nicht signifikant.

Eosinophile Granulozyten werden üblicherweise als Effektor-Zellen bei parasitären Krankheiten und als Modulatoren einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I betrachtet. Während man diese Zellen in histologischen Präparaten von Haut gesunder Hunde selten findet, ist deren Zellzahl bei caniner atopischer Dermatitis nahezu um das Zehnfache erhöht (HILL & OLIVRY 2001). WILKIE *et al.* (1990) fanden in der Haut atopischer Hunde eine signifikant höhere Menge eosinophiler Granulozyten als bei gesunden Hunden (WILKIE *et al.* 1990). OLIVRY *et al.* (1997) sahen in der Haut gesunder Hunde keine eosinophilen Granulozyten. Der Prozentsatz eosinophiler Granulozyten in der Dermis war in läsionaler Haut von Hunden mit caniner atopischer Dermatitis signifikant höher als in nicht-läsionaler oder der Haut gesunder Hunde (OLIVRY *et al.* 1997). SCOTT (1981) fand eosinophile Granulozyten nur in 15 % histopathologischer Schnitte und dann auch nur in sehr geringen Mengen (SCOTT 1981). Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich die mittlere Zellzahl pro mm² von eosinophilen Granulozyten am Ende des Versuches reduziert hatte, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Hinsichtlich des Vorkommens neutrophiler Granulozyten in histologischen Präparaten der Haut atopischer Hunde existieren widersprüchliche Angaben in der Literatur. SCOTT (1981) entdeckte neutrophile Granulozyten in 80 % der Schnitte läsionaler Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis. Er sah vorwiegend mononukleäre Zellen und neutrophile Granulozyten im entzündlichen zellulären Infiltrat (SCOTT 1981). Spätere Studien haben diese Ergebnisse angefochten (HILL & OLIVRY 2001). Eine Studie von OLIVRY *et al.* (1997) zeigte, dass neutrophile Granulozyten nur zu einem geringen Anteil im zellulären entzündlichen Infiltrat bei caniner atopischer Dermatitis vertreten sind (OLIVRY *et al.* 1997). Am Ende des vorliegenden Versuches hatte sich die mittlere Zellzahl neutrophiler Granulozyten erhöht. Diese Erhöhung war aber statistisch nicht signifikant.

Lymphozyten sind kritische Zellen bei jeder erworbenen Immunantwort. B-Lymphozyten sind verantwortlich für die Produktion von Antikörpern im Rahmen der humoralen Immunantwort. T-Lymphozyten sind Effektor-Zellen der zellmedierten Immunität und produzieren beispielsweise Zytokine (HILL & OLIVRY 2001). B-Lymphozyten machen im Gegensatz zu T-Lymphozyten keinen wichtigen Bestandteil des zellulären entzündlichen Infiltrats der Haut atopischer Hunde aus (OLIVRY *et al.* 1997). Am Ende des vorliegenden Versuches zeigten die Lymphozyten eine verminderte mittlere Zellzahl ohne statistische Signifikanz. Um über die Verteilung der Lymphozyten in der Haut atopischer Hunde eine genauere Aussage treffen zu können, sollte eine weitere Auswertung der histologischen Schnitte anhand einer immunhistochemischen Färbung mit einem polyklonalen CD3-Antikörper erfolgen. Die Präparate aus den vier Millimeter großen Hautstanzen der atopischen Hunde erwiesen sich in diesem Versuch als nicht geeignet für eine immunhistochemische Färbung, da sich große Teile des Gewebes während des Vorbereitungs- und Färbeprozesses von den Objektträgern lösten und die Schnitte daher nicht ausgewertet werden konnten. Gründe hierfür könnten gewesen sein, dass die Haut ein inhomogenes Gewebe darstellt, das aus Epidermis, Dermis, zahlreichen Kollagenfasern und Haaren besteht. Daher sind die histologischen Schnitte meist nicht ganz glatt, was das Ablösen von Anteilen begünstigen könnte. Außerdem greift die Behandlung mit der Mikrowelle das Gewebe stark an. Aus diesem Grund wurden die Schnitte alternativ im Wasserbad bei 95 – 98 °C behandelt, was allerdings ähnlich unzufriedenstellende Ergebnisse erbrachte. Des Weiteren könnte die Größe der Schnitte mit einem Durchmesser von vier Millimetern zu klein gewesen sein.

Abweichende Ergebnisse für die Zusammensetzung des zellulären entzündlichen Infiltrats der vorliegenden Studie zu den genannten Untersuchungen könnten durch unterschiedliche Stadien der Chronizität und des Schweregrades der in diesem Versuch biopsierten Läsionen bedingt sein. Zusammenfassend bestand das zelluläre entzündliche Infiltrat der läsionalen Haut von Hunden mit atopischer Dermatitis in dieser Studie vorwiegend aus Lymphozyten und Mastzellen. Eosinophile und neutrophile Granulozyten waren in geringerer Anzahl vertreten. Auch OLIVRY *et al.* (1999) beobachteten in histopathologischen Schnitten läsionaler Haut atopischer Hunde eine Entzündung, die reich an Mastzellen und mononukleären Zellen (Lymphozyten und histiozytäre/dendritische Zellen) war (OLIVRY *et al.* 1999). Die Veränderungen des zellulären entzündlichen Infiltrats am Ende der Studie zeigten keine statistische Signifikanz. Dies kann einerseits an der kleinen Zahl der in den Versuch eingeschlossenen Hunde gelegen haben. Zum anderen könnte es sein, dass die Halbwertszeit der Zellen bei chronischer Atopie in der Haut länger ist und daher keine signifikante Änderung der Zellzahl nach drei Monaten zu erwarten war. Bei den atopischen Hunden dieses Versuches war die Erkrankung bereits längere Zeit zuvor diagnostiziert worden, so dass man nicht mehr von einem akuten Stadium sprechen kann, in dem Änderungen des zellulären Infiltrats unter Umständen nach der Behandlung deutlicher gewesen wären.

5.8. Ergebnisse der Kotuntersuchungen

In keiner der Kotuntersuchungen im Laufe der Studie konnten Eier von *T. vulpis* nachgewiesen werden. Eier von *U. stenocephala* konnten dagegen regelmäßig gefunden werden. Die Untersuchung der Kotproben erfolgte mit Hilfe des kommerziellen Parasiten-Diagnose-Systems der Firma Janssen-Cilag nach Angaben des Herstellers im Labor der Medizinischen Kleintierklinik.

T. vulpis besitzt nach verschiedenen Literaturangaben eine lange Präpatenzzeit von 70 – 90 Tagen (KIRKOVA & DINEV 2005, RUBIN 1954). Somit kann es durchaus etwa drei Monate dauern, bis zum ersten Mal Geschlechtsprodukte (Eier) nachweisbar sind. Da die vorliegende Studie drei Monate nach der Verabreichung der Helminthen beendet wurde, könnte ein Grund, warum *T. vulpis* nicht nachweisbar war, die lange Präpatenz gewesen sein.

Die Eier von *T. vulpis* können zwar leicht identifiziert werden, werden aber nur intermittierend ausgeschieden, auch bei stark infizierten Tieren (JACOBS 1984). Deshalb ist ein Nachweis nicht in jeder Kotprobe eines infizierten Tieres möglich, falsch-negative Ergebnisse sind denkbar. Die Annahme, aus der Anzahl ausgeschiedener Eier Rückschlüsse auf die Befallsintensität zu ziehen, muss daher kritisch bewertet werden. Um die Nachweisbarkeit zu erhöhen, wurden die Besitzer in dieser Studie gebeten, direkt vor den Kontrollterminen Sammelkotproben über drei Tage zu nehmen. Eine unsachgemäße oder falsche Probennahme durch die Besitzer kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Die Prävalenz einer *T. vulpis*-Infektion ist bei Hunden bis zu einem Jahr signifikant höher als bei älteren Hunden (BARUTZKI & SCHAPER 2003). Dies könnte an der Entwicklung einer Immunität bei älteren Hunden liegen, wie sie für *T. suis* beim Schwein beschrieben wurde (PEDERSEN & SAEED 2001), die mit einer geringeren Entwicklung der Würmer im Wirt und somit einer reduzierten Eiausscheidung einhergeht, was die Nachweisbarkeit zusätzlich erschwert.

Die Sensitivität von Flotationsverfahren ist von dem Flotationsmedium, der eingesetzten Kotmenge, der Eizahl/g Kot und weiteren Faktoren abhängig. Im Durchschnitt liegt die Sensitivität bei 70 – 90 %. Die Spezifität ist groß. Im Handel sind mehrere kommerzielle Test-Kits für Flotationsverfahren, wie das in dieser Studie benutzte Parasiten-Diagnose-System, erhältlich. Besonders bei niedrigen Eizahlen/g Kot ist deren Sensitivität häufig geringer, da wenig Kot eingesetzt wird (ECKERT *et al.* 2008).

Das spezifische Gewicht der Eier von *T. vulpis* liegt bei 1,1453 (DAVID & LINDQUIST 1982). Damit Parasiteneier flotieren, muss das spezifische Gewicht der verwendeten Flotationslösung höher sein, als das der Eier (DRYDEN *et al.* 2005). Im für diesen Versuch verwendeten Kit enthielt die Flotationslösung 29,5%iges Natriumnitrat und besaß ein spezifisches Gewicht von 1,2. ZAJAC *et al.* (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass man mittels Flotation in Kombination mit Zentrifugation signifikant mehr Helmintheneier nachweisen kann als mit der einfachen Flotation. Dies galt besonders für *T. vulpis*-Eier. Diese haben ein relativ hohes spezifisches Gewicht im Vergleich zu anderen Helmintheneiern und flotieren bei der einfachen Flotation in der vorgegebenen Zeit eher unvollständig (ZAJAC *et al.* 2002). Für die vorliegende Studie wurde die Flotation nicht mit einer Zentrifugation verbunden. O'GRADY und SLOCOMBE (1980) konnten zeigen, dass Hakenwurm-

eier und Eier von *T. vulpis* im Kot von Hunden in Natriumnitrat-Lösungen mit einem spezifischen Gewicht zwischen 1,22 und 1,38 immer etwa gleich gut flotierten. *T. vulpis* konnte auch bei einem spezifischen Gewicht der Lösung von 1,11 gefunden werden, allerdings in geringer Anzahl (O'GRADY & SLOCOMBE 1980). RINALDI *et al.* (2006) nutzten für ihre Studie über die Kontamination mit Hundekot in Neapel Natriumnitrat-Lösung mit einem spezifischen Gewicht von 1,2 für die Erfassung von *T. vulpis*-Eiern. Damit wurde *T. vulpis* in 42 von 415 Kotproben (10,1 %) nachgewiesen (RINALDI *et al.* 2006). Dass die Eier von *T. vulpis* im vorliegenden Versuch nicht nachweisbar waren, könnte auch an der Varianz innerhalb der Methode liegen und daran, dass die Untersuchung nicht immer von der gleichen Person durchgeführt wurde.

VI. Zusammenfassung

Der Einfluss von Helminthen auf die canine atopische Dermatitis

Das Vorkommen von Allergien hat in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen, vor allem in den Industrieländern. Neben einer genetischen Veranlagung spielen auch Umweltfaktoren eine bedeutende Rolle für die Entwicklung allergischer Krankheiten. Die sogenannte „Hygiene-Hypothese“ geht davon aus, dass verringerter Infektionsdruck in der Kindheit das Risiko des Auftretens von Allergien erhöht. Helmintheninfektionen korrelieren negativ mit Atopie und der Prävalenz allergischer Erkrankungen. Durch Modulation des Immunsystems entfalten Helminthen einen schützenden Effekt.

Die canine atopische Dermatitis ist eine häufig auftretende Erkrankung und kann als Tiermodell für die humane Form der Krankheit dienen. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren keine Daten über die Immunmodulation durch Helminthen bei Hunden mit atopischer Dermatitis.

Das Ziel dieser Studie war herauszufinden, ob *T. vulpis* oder *U. stenocephala* einen immunmodulierenden Effekt bei atopischen Hunden haben und ob gegebenenfalls solch eine Wirkung mit einer Veränderung klinischer Symptome, geänderter Histopathologie oder verändertem kutanen Zytokinprofil einhergeht.

Es wurden zwölf Hunde mit diagnostizierter nicht saisonaler atopischer Dermatitis in diese Studie eingeschlossen. Die Tiere wurden ursprünglich vor der Studie randomisiert in vier Gruppen unterteilt. Drei Hunde erhielten 500 embryonierte Eier von *T. vulpis*. Weitere drei Hunde bekamen 2500 embryonierte Eier derselben Helminthenspezies. In den gleichen Dosen sollten L3 von *U. stenocephala* an je drei Hunde verabreicht werden. Allerdings wurde aufgrund von Nebenwirkungen wie Durchfall und Erbrechen die Dosis für den jeweils letzten Hund in den beiden *Uncinaria*-Gruppen auf 100 Larven reduziert.

Die Hunde wurden zu Beginn der Studie sowie nach einem, zwei und drei Monaten untersucht. Die Bewertung des Schweregrades der Läsionen durch die atopische Dermatitis erfolgte dabei mit Hilfe eines validierten klinischen Punktwertes (CADESI). Die Beurteilung des jeweils aktuellen Juckreizes erfolgte anhand einer visuellen Analogskala. Am Anfang und am Ende des Versuches erfolgte außerdem eine allgemeine Einschätzung des Hautzustandes durch den Besitzer.

Für die Bestimmung der kutanen Expression von IL-4, IL-10, IFN- γ und TGF- β unter Einsatz der qPCR und zur Anfertigung histologischer Präparate wurden beim Eintritt in die Studie und zu deren Abschluss je drei vier Millimeter große Hautstanzen bei jedem Hund entnommen. Im Labor wurde aus den Hautstanzen RNA isoliert und in der qPCR zur Analyse der Zytokinexpression eingesetzt. Von einer Hautstanze wurden durch das Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München histologische Schnitte angefertigt, die nach Giemsa und nach Luna gefärbt wurden. In diesen Schnitten erfolgte die Auszählung von Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Lymphozyten. Außerdem wurde eine immunhistochemische Färbung mit Hilfe eines polyklonalen CD3-Antikörpers durchgeführt. Allerdings zerbrach das Gewebe bei dieser Technik in winzige Anteile, was eine Auswertung nicht zuließ.

Sammelkotproben der Hunde wurden monatlich im Labor der Medizinischen Kleintierklinik auf Endoparasiten untersucht. Beim letzten Kontrolltermin wurden alle Hunde entwurmt.

Fasste man die Werte aller atopischen Hunde zusammen, führte die Verabreichung der Helminthen zu einer signifikanten Reduktion der CADESI-Werte ($P = 0,0005$) sowie des Juckreizes ($P = 0,0425$). Betrachtete man die *Trichuris*- und *Uncinaria*-Behandlungsgruppen für sich, so trat nur bei den CADESI-Werten eine statistisch signifikante Reduktion auf. Der Hautzustand von acht Hunden wurde am Ende der Studie von den Besitzern besser beurteilt als am Anfang. Es konnte weder IFN- γ mRNA noch IL-4 mRNA in der Haut atopischer Hunde detektiert werden. TGF- β mRNA und IL-10 mRNA konnten in allen Proben gemessen werden. Allerdings waren die Änderungen der Zytokinexpression am Ende der Studie sehr variabel und statistisch nicht signifikant. Das zelluläre entzündliche Infiltrat (Mastzellen, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten) verminderte sich nicht signifikant. In keiner der Kotproben der Tiere, die embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, konnte dieser Helminth nachgewiesen werden. Eier von *U. stenocephala* wurden zum Ende der Studie in allen Kotproben aufgefunden.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die Verabreichung von Helminthen das klinische Bild der caninen atopischen Dermatitis verbessern kann.

VII. Summary

The influence of helminths on canine atopic dermatitis

The prevalence of allergies has increased dramatically over the last decades, especially in industrialized countries. Besides a genetic predisposition, environmental factors are of main importance for the development of allergic diseases. The so called 'hygiene hypothesis' indicates that reduced exposure to infections in childhood increases the risk of allergic diseases. Helminth infections are negatively correlated with atopy and the prevalence of allergic diseases. Helminths have a protective effect through modulation of the immune system.

Canine atopic dermatitis is a common disease and is considered as an animal model of the human disease. Currently, there is no published evidence of immunomodulation by helminths in dogs with atopic dermatitis.

The aim of this study was to determine, whether *T. vulpis* or *U. stenocephala* have an immune-modulating effect in dogs with atopic dermatitis and if such an effect is associated with a change in clinical signs, histopathology or a changed cutaneous cytokine profile.

Twelve dogs diagnosed with nonseasonal atopic dermatitis were included in this study. Treatment type of the originally considered four groups of dogs was randomised prior to the study. Three dogs received 500 embryonated eggs of *T. vulpis*. Another three dogs were administered 2500 embryonated eggs of the same helminth species. L3 of *U. stenocephala* were supposed to be administered in the same doses to three dogs each. However, because of adverse effects such as diarrhea and vomiting the dose for the last two dogs in both *Uncinaria* groups was reduced to 100 L3.

The dogs were examined at the beginning of the study and monthly for three months. Evaluation of the severity of canine atopic dermatitis lesions was performed with a validated clinical score (CADESI). Pruritus was determined using a visual analogue scale. At the beginning and at the end of the study the owner assessed the dog's skin condition globally.

For the determination of the cutaneous expression of IL-4, IL-10, IFN- γ and TGF- β using qPCR and for histologic evaluation, three skin biopsy specimens of each dog with a diameter of 4 mm were obtained at their first and last visit. RNA was extracted from the skin biopsies and used for qPCR to analyze the cytokine expression. One biopsy specimen was processed by the Institute of Veterinary

Pathology, Ludwig Maximilian University Munich. Histological sections were stained with Giemsa and Luna stain. In each section the number of mast cells, neutrophils, eosinophils and lymphocytes was determined. The specimens were also stained with a polyclonal CD3-antibody. However, technical problems prevented use of this stain for cell counts.

Faecal samples were examined monthly for endoparasites in the laboratory of the Clinic for Small Animal Medicine. All dogs were dewormed at their last visit.

Grouping all atopic dogs together, administration of helminths resulted in a significant reduction in CADESI scores ($P = 0,0005$) and pruritus ($P = 0,0425$). Evaluating the *Trichuris* and the *Uncinaria* group separately, only the reduction of CADESI scores was statistically significant. For eight owners, the skin condition of their dog at the end of the study had improved. Neither IL-4 mRNA nor IFN- γ mRNA could be detected in any of the skin specimens of the atopic dogs. TGF- β mRNA and IL-10 mRNA could be measured in all samples, but did not change significantly. Cutaneous mast cells, eosinophils and lymphocytes decreased, albeit not significantly. *T. vulpis* could not be detected in any of the faecal samples of the animals that had been given embryonated eggs of this helminth. Eggs of *U. stenocephala* were found in all examined faecal samples at the end of the study.

The results of this study indicate that administration of helminths can improve the clinical appearance of canine atopic dermatitis.

VIII. Literaturverzeichnis

Abba C, Mussa PP, Vercelli A, Raviri G. Essential fatty acids supplementation in different-stage atopic dogs fed on a controlled diet. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2005;89(3-6):203-7.

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.

Abramovits W. Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2005;53(1 Suppl 1):S86-93.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998;102(1):98-106.

Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(5):961-8.

Aksoy E, Zouain CS, Vanhoutte F, Fontaine J, Pavelka N, Thieblemont N, et al. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem* 2005;280(1):277-83.

Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Jr., Alcantara L, Almeida MC, Schrieffer A, et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis* 2004;190(10):1797-803.

Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Sole D, et al. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;123(2):145-8.

Arruda LK, Santos AB. Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(5):399-402.

Auxilia ST, Hill PB. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Vet Dermatol* 2000;11(4):247-54.

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94(6):557-72.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003;300(5625):1524-5.

Barutzki D, Schaper R. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitol Res* 2003;90 Suppl 3:S148-50.

Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* 2004;59(6):566-73.

Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ, Shi HN, Nagler-Anderson C. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J Immunol* 2002;169(6):3284-92.

Blackwell V, Vega-Lopez F. Cutaneous larva migrans: clinical features and management of 44 cases presenting in the returning traveller. *Br J Dermatol* 2001;145(3):434-7.

Bond R, Lloyd DH. A double-blind comparison of olive oil and a combination of evening primrose oil and fish oil in the management of canine atopy. *Vet Rec* 1992;131(24):558-60.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81(5 Pt 1):401-5.

Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med* 1995;181(4):1373-80.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25(2):169-93.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34(3):597-601.

Carvalho EM, Bastos LS, Araujo MI. Worms and allergy. *Parasite Immunol* 2006;28(10):525-34.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000;77(1):41-51.

Clapham PA. Canine hookworm disease. *J Small Anim Pract* 1962;3(3):133-6.

Codner EC, Lessard P. Comparison of intradermal allergy test and enzyme-linked immunosorbent assay in dogs with allergic skin disease. *J Am Vet Med Assoc* 1993;202(5):739-43.

Coffman RL, Carty J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol* 1986;136(3):949-54.

Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):995-1000.

Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Strachan DP, Anderson HR, Rodriguez EA, et al. Risk factors for atopy among school children in a rural area of Latin America. *Clin Exp Allergy* 2004;34(6):845-52.

Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(1):171-7.

Curtis CF. Current trends in the treatment of *Sarcoptes*, *Cheyletiella* and *Otodectes* mite infestations in dogs and cats. *Vet Dermatol* 2004;15(2):108-14.

Dagoye D, Bekele Z, Woldemichael K, Nida H, Yimam M, Hall A, et al. Wheezing, allergy, and parasite infection in children in urban and rural Ethiopia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(10):1369-73.

David ED, Lindquist WD. Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation. *J Parasitol* 1982;68(5):916-9.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* 2000;109(1):16-22.

de Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 2003;19(12):547-51.

DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):323-9.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):271-6.

Deboer DJ, Schafer JH, Salsbury CS, Blum JR, Beale KM, Vitale CB, et al. Multiple-center study of reduced-concentration triamcinolone topical solution for the treatment of dogs with known or suspected allergic pruritus. *Am J Vet Res* 2002;63(3):408-13.

Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150(2):353-60.

DeMora F, Garcia G, Puigdemont A, Arboix M, Ferrer L. Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflamm Res* 1996;45(8):424-7.

Dryden MW, Payne PA, Ridley R, Smith V. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet Ther* 2005;6(1):15-28.

Dunn JJ, Columbus ST, Aldeen WE, Davis M, Carroll KC. *Trichuris vulpis* recovered from a patient with chronic diarrhea and five dogs. *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2703-4.

Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P. *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. 2nd ed. Stuttgart: Enke Verlag; 2008.

Elliott DE, Li J, Blum A, Metwali A, Qadir K, Urban JF, Jr., et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(3):G385-91.

Elliott DE, Setiawan T, Metwali A, Blum A, Urban JF, Jr., Weinstock JV. *Heligmosomoides polygyrus* inhibits established colitis in IL-10-deficient mice. *Eur J Immunol* 2004;34(10):2690-8.

Falcao PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol* 1998;20(10):447-54.

Falcone FH, Pritchard DI. Parasite role reversal: worms on trial. *Trends Parasitol* 2005;21(4):157-60.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* 2004;201:139-55.

Fisher M. Endoparasites in the dog and cat. 1. Helminths. In *Pract* 2001;23:462-71.

Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB, Stadecker MJ. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol* 1996;156(9):3315-20.

Graham SP, Trees AJ, Collins RA, Moore DM, Guy FM, Taylor MJ, et al. Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both gamma interferon and interleukin-4 responses in a bovine model of onchocerciasis. *Infect Immun* 2001;69(7):4313-9.

Grewe M, Bruijnzeel-Koomen CA, Schopf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG, Ruzicka T, et al. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 1998a;19(8):359-61.

Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Klammer M, Kapp A, et al. Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. *J Immunol* 1998b;161(1):415-20.

Griffin CE. Canine atopic disease. In: Griffin CE, Kwochka KW, MacDonald JM, editors. *Current Veterinary Dermatology*. St. Louis: Mosby; 1993. p. 99-120.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):255-69.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):363-83.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389(6652):737-42.

Hagel I, Lynch NR, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Rojas E. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite Immunol* 1993;15(6):311-5.

Halliwell RE. Atopic disease in the dog. *Vet Rec* 1971;89(8):209-14.

Halliwell RE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):159-67.

Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest* 2000;105(1):61-70.

Harnett W, Harnett MM. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunol* 2006;28(10):535-43.

Harnett W, Harnett MM, Leung BP, Gracie JA, McInnes IB. The anti-inflammatory potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. *Curr Top Med Chem* 2004;4(5):553-9.

Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 2003;33(11):1291-302.

Harvey RG. A blinded, placebo-controlled study of the efficacy of borage seed oil and fish oil in the management of canine atopy. *Vet Rec* 1999;144(15):405-7.

Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 2004;20(5):623-35.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(5):3157-66.

Hill PB, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):187-98.

Hites MJ, Kleinbeck ML, Loker JL, Lee KW. Effect of immunotherapy on the serum concentrations of allergen-specific IgG antibodies in dog sera. *Vet Immunol Immunopathol* 1989;22(1):39-51.

Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80(3 Pt 2):S40-5.

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 2008;118(4):1311-21.

Hurst MH, Lola SG, Lindberg R. Immunomodulation of the hepatic egg granuloma in *Schistosoma japonicum*-infected pigs. *Parasite Immunol* 2006;28(12):681-6.

Ihrke PJ, Norton AL, Ling GV, Stannard AA. Urinary tract infection associated with long-term corticosteroid administration in dogs with chronic skin diseases. *J Am Vet Med Assoc* 1985;186(1):43-6.

Inman AO, Olivry T, Dunston SM, Monteiro-Riviere NA, Gatto H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Vet Pathol* 2001;38(6):720-3.

International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998;351(9111):1225-32.

Jacobs D. Helminths of the dog: treatment and control. *In Pract* 1984;6(1):10, 12-3, 16-8.

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998;160(7):3555-61.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33(5):1205-14.

Kay AB, Ying S, Varney V, Gaga M, Durham SR, Moqbel R, et al. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 1991;173(3):775-8.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;123(3-4):337-44.

Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, et al. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun* 2002;70(11):5931-7.

Kirkova Z, Dinev I. Morphological changes in the intestine of dogs, experimentally infected with *Trichuris vulpis*. *Bulg J Vet Med* 2005;8(4):239-43.

Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997a;9(6):416-26.

Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP, Savelkoul HF. T cells subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. II. Analysis and IL-5 and IL-10 mRNA expression and protein production. *Cytokine* 1997b;9(6):427-36.

Lal RB, Dhawan RR, Tarrand JJ, Ayoub EM, Ottesen EA. Lack of IgG4 antibody response to carbohydrate antigens in patients with lymphatic filariasis. *Immunology* 1991;74(2):333-7.

Langley JG, Kariuki HC, Hammersley AP, Ouma JH, Butterworth AE, Dunne DW. Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Immunology* 1994;83(4):651-8.

Leung DY. Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96(3):302-18.

Leung DY. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(3 Pt 2):S99-108.

Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(5):860-76.

Leung DY, Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71(1 Pt 1):47-56.

Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003;361(9352):151-60.

Lian TM, Halliwell RE. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;66(3-4):203-23.

Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clin Exp Allergy* 2002;32(11):1659-66.

Lu FM, Chou CC, Chiang BL, Hsieh KH. Immunologic changes during immunotherapy in asthmatic children: increased IL-13 and allergen-specific IgG4 antibody levels. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80(5):419-23.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(9):1336-41.

Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(3):404-11.

Lynch NR, Lopez RI, Di Prisco-Fuenmayor MC, Hagel I, Medouze L, Viana G, et al. Allergic reactivity and socio-economic level in a tropical environment. *Clin Allergy* 1987;17(3):199-207.

Lynch NR, Palenque M, Hagel I, DiPrisco MC. Clinical improvement of asthma after anthelminthic treatment in a tropical situation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(1):50-4.

Maeda S, Fujiwara S, Omori K, Kawano K, Kurata K, Masuda K, et al. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;88(1-2):79-87.

Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol* 2004;173(10):6346-56.

Marsella R. Calcineurin inhibitors: a novel approach to canine atopic dermatitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2005;41(2):92-7.

Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 2006;17(5):306-12.

Marsella R, Olivry T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXII): nonsteroidal anti-inflammatory pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):331-45.

Marsella R, Olivry T. Animal models of atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2003;21(2):122-33.

Marsella R, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): threshold phenomenon and summation of effects. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):251-4.

Masuda Y, Kishimoto T, Ito H, Tsuji M. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis* presenting as a pulmonary mass. *Thorax* 1987;42(12):990-1.

McEwen BJ. Eosinophils: a review. *Vet Res Commun* 1992;16(1):11-44.

McGreal EP, Miller JL, Gordon S. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17(1):18-24.

Medeiros M, Jr., Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araujo MI, Cruz AA, et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(5):947-51.

Meinking TL, Burkhart CN, Burkhart CG. Changing paradigms in parasitic infections: common dermatological helminthic infections and cutaneous myiasis. *Clin Dermatol* 2003;21(5):407-16.

Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:304-28.

Mueller RS, Bettenay SV, Shipstone M. Value of the pinna-pedal reflex in the diagnosis of canine scabies. *Vet Rec* 2001;148(20):621-3.

Mueller RS, Fieseler KV, Fettman MJ, Zabel S, Rosychuk RA, Ogilvie GK, et al. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J Small Anim Pract* 2004;45(6):293-7.

Mueller RS, Fieseler KV, Rosychuk RA, Greenwalt T. Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Vet Dermatol* 2005;16(1):27-31.

Naus CW, Kimani G, Ouma JH, Fulford AJ, Webster M, van Dam GJ, et al. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naive immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age. *Infect Immun* 1999;67(7):3444-51.

Nauta AJ, Engels F, Knippels LM, Garssen J, Nijkamp FP, Redegeld FA. Mechanisms of allergy and asthma. *Eur J Pharmacol* 2008;585(2-3):354-60.

Nesbitt GH, Kedan GS, Caciolo P. Canine atopy, part I. Etiology and diagnosis. *Comp Cond Educ* 1984(6):73-84.

Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 2003;171(6):3262-9.

Novak N, Bieber T, Leung DY. Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(6 Suppl):S128-39.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2002a;32(5):789-95.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2002b;87(3-4):379-84.

O'Grady MR, Slocombe JO. An investigation of variables in a fecal flotation technique. *Can J Comp Med* 1980;44(2):148-57.

Oh JW, Seroogy CM, Meyer EH, Akbari O, Berry G, Fathman CG, et al. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(3):460-8.

Olivry T, Dean GA, Tompkins MB, Dow JL, Moore PF. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Exp Dermatol* 1999;8(3):204-11.

Olivry T, DeBoer DJ, Griffin CE, Halliwell RE, Hill PB, Hillier A, et al. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a;81(3-4):143-6.

Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):305-9.

Olivry T, Marsella R, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Vet Immunol Immunopathol* 2001b;81(3-4):347-62.

Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2007;18(2):78-86.

Olivry T, Moore PF, Affolter VK, Naydan DK. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1996;288(10):579-85.

Olivry T, Mueller R, Nuttall T, Favrot C, Prelaud P. Determination of CADESI-03 thresholds for increasing severity levels of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2008;19(3):115-9.

Olivry T, Mueller RS. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2003;14(3):121-46.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *Am J Dermatopathol* 1997;19(5):477-86.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a;81(3-4):311-6.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b;81(3-4):317-22.

Palmer DR, Bradley M, Bundy DA. IgG4 responses to antigens of adult *Necator americanus*: potential for use in large-scale epidemiological studies. *Bull World Health Organ* 1996;74(4):381-6.

Palmer LJ, Celedon JC, Weiss ST, Wang B, Fang Z, Xu X. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(11):1489-93.

Paterson S. Use of antihistamines to control pruritus in atopic dogs. *J Small Anim Pract* 1994;35(8):415-9.

Paterson S. Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. *J Small Anim Pract* 1995;36(9):389-94.

Pedersen S, Saeed I. Acquired immunity to *Trichuris suis* infection in pigs. *Parasitology* 2001;123(Pt 1):95-101.

Pincus SH, Butterworth AE, David JR, Robbins M, Vadas MA. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*: lack of requirement for oxidative metabolism. *J Immunol* 1981;126(5):1794-9.

Plaut M. Antigen-specific lymphokine secretory patterns in atopic disease. *J Immunol* 1990;144(12):4497-500.

Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM, Hammerberg B. Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2008;38(4):667-79.

Ramsey CD, Celedon JC. The hygiene hypothesis and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11(1):14-20.

Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38(4):378-88.

Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001;13(6):644-9.

Rinaldi L, Biggeri A, Carbone S, Musella V, Catelan D, Veneziano V, et al. Canine faecal contamination and parasitic risk in the city of Naples (southern Italy). *BMC Vet Res* 2006;2:29.

Rivera-Roig V, Sanchez JL, Hillyer GV. Hookworm folliculitis. *Int J Dermatol* 2008;47(3):246-8.

Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105(3):399-408.

Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy* 2001;31(5):694-704.

Rubin R. Studies on the common whipworm of the dog. *Trichuris vulpis*. *Cornell Vet* 1954;44(1):36-49.

Ruckstuhl N, Hoerauf A, Tomsa K, Reusch C. Pseudohypoadrenokortizismus bei zwei Siberian Huskies mit gastrointestinalen Parasitosen. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2002;144(2):75-81.

Saevik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar A, Larsen S, et al. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004;15(3):137-45.

Sakano T, Hamamoto K, Kobayashi Y, Sakata Y, Tsuji M, Usui T. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis*. *Arch Dis Child* 1980;55(8):631-3.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;69(1):61-73.

Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 1992;13(4):136-42.

Scott DW. Observations on canine atopy. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981;17:91-100.

Scott DW, Buerger RG. Nonsteroidal antiinflammatory agents in the management of canine pruritus. *J Am Anim Hosp Assoc* 1988;24:425-8.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. *Small animal dermatology*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001.

Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987-1988). *Can Vet J* 1990;31(12):830-5.

Scrivener S, Yemaneberhan H, Zebenigus M, Tilahun D, Girma S, Ali S, et al. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. *Lancet* 2001;358(9292):1493-9.

Sears MR. Descriptive epidemiology of asthma. *Lancet* 1997;350 Suppl 2:SII1-4.

Sereda MJ, Hartmann S, Lucius R. Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends Parasitol* 2008;24(6):272-8.

Shackelford PG, Nelson SJ, Palma AT, Nahm MH. Human antibodies to group A streptococcal carbohydrate. Ontogeny, subclass restriction, and clonal diversity. *J Immunol* 1988;140(9):3200-5.

Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:423-49.

Shida M, Kadoya M, Park SJ, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;102(1-2):19-31.

Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ, Hill PB. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Vet Dermatol* 2005;16(6):385-91.

Sousa CA, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;81(3-4):153-7.

Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112(6 Suppl):S118-27.

Steffan J, Favrot C, Mueller R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol* 2006;17(1):3-16.

Stehle ME, Goebel T, Hanczaruk M, Mueller RS. The influence of polyunsaturated fatty acids on T cell response in dogs with atopic dermatitis. Proceedings of the 22th North American Veterinary Dermatology Forum, Lihue, Kauai. *Vet Dermatol* 2007;18:194.

Stoye M. Ascariden- und Ankylostomideninfektionen des Hundes. *Tierärztl Prax* 1983;11:229-43.

Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(9):2034-41.

Taglinger K, Van Nguyen N, Helps CR, Day MJ, Foster AP. Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;122(3-4):216-30.

Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, et al. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(4):336-44.

Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4⁺ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100(1):1-6.

van den Biggelaar AH, Lopuhaa C, van Ree R, van der Zee JS, Jans J, Hoek A, et al. The prevalence of parasite infestation and house dust mite sensitization in Gabonese schoolchildren. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;126(3):231-8.

van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YC, Souverijn JH, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis* 2004;189(5):892-900.

van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356(9243):1723-7.

van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4⁺ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991;97(3):389-94.

van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277(50):48122-9.

van Reijsen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, et al. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90(2):184-93.

Velupillai P, dos Reis EA, dos Reis MG, Harn DA. Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. *Hum Immunol* 2000;61(3):225-32.

Vliagoftis H, Befus AD. Mast cells at mucosal frontiers. *Curr Mol Med* 2005;5(6):573-89.

Walker MJ, Jacobs DE. Studies on the epidemiology of *Uncinaria stenocephala* infections in British greyhounds: development and persistence of larvae on herbage. *Res Vet Sci* 1981;31(2):264-5.

Werfel T, Morita A, Grewe M, Renz H, Wahn U, Krutmann J, et al. Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1996;107(6):871-6.

Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, et al. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2⁺ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* 1990;144(12):4651-6.

Wilkie JS, Yager JA, Eyre P, Parker WM. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Vet Pathol* 1990;27(3):179-86.

Willemse A. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract* 1986;27(11):771-8.

Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, et al. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(1 Pt 1):125-38.

Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, et al. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 2004;16(4):585-96.

Wordemann M, Diaz RJ, Heredia LM, Collado Madurga AM, Ruiz Espinosa A, Prado RC, et al. Association of atopy, asthma, allergic rhinoconjunctivitis, atopic dermatitis and intestinal helminth infections in Cuban children. *Trop Med Int Health* 2008;13(2):180-6.

Worm M, Henz BM. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med* 1997;75(6):440-7.

Yazdanbakhsh M, Matricardi PM. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol* 2004;26(1):15-24.

Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005;5(5):386-91.

Zajac AM, Johnson J, King SE. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38(3):221-4.

Zouain CS, Falcao PL, Goes TS, Leite MF, Goes AM. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans. *Immunol Lett* 2004;91(2-3):113-8.

Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Vet Dermatol* 2002a;13(2):89-102.

Zur G, White SD, Ihrke PJ, Kass PH, Toebe N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Vet Dermatol* 2002b;13(2):103-11.

IX. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Von T _H 2-Zellen ausgehende Stimulierung auf B-Zellen und eosinophile Granulozyten durch IL-4, IL-13 und IL-5.....	28
Abbildung 2: Das Immunsystem des Wirtes produziert IL-10 und TGF- β als Antwort auf die Stimulation durch parasitäre Antigene.	34
Abbildung 3: T _H 2-Zytokine stimulieren die Antikörperproduktion durch B-Zellen, wirken hemmend auf Makrophagen und die Bildung von T _H 1-Zellen und fördern die Entwicklung von basophilen Granulozyten, Mastzellen sowie eosinophilen Granulozyten.....	41
Abbildung 4: In chronischen Läsionen bilden Makrophagen, dendritische Zellen und eosinophile Granulozyten IL-12. Dieses induziert T _H 1-Zellen, die vor allem IFN- γ produzieren.....	42
Abbildung 5: Die Induktion regulatorischer T-Zellen (T _{reg}) und die Bildung von IL-10 und TGF- β sind bedeutend für den Erfolg einer allergenspezifischen Immuntherapie. Dadurch wird sowohl die Immunantwort (T _H 1, T _H 2), als auch die Funktion von eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie Mastzellen gehemmt. Außerdem wird dadurch die Antikörperproduktion durch B-Zellen reguliert (angelehnt an AKDIS <i>et al.</i> 2005).	44
Abbildung 6: a) Elektrophoretische Darstellung der aufgeschlüsselten Gesamt-RNA im zeitlichen Verlauf. Deutlich zu sehen sind die Spitzen von 5S, 18S und 28S rRNA. Auf der y-Achse sind die fluoreszierenden Einheiten (FU), auf der x-Achse die Zeit in Sekunden [s] aufgetragen. Die RNA Integritätsnummer dieser Probe betrug 9,9. b) Spezifische Banden für 5S, 18S und 28S rRNA auf einem Agarosegel.....	65
Abbildung 7: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe. Die letzten sieben Stufen einer log ₁₀ -Verdünnungsreihe wurden als Matrize in der qPCR eingesetzt. Als „Cycle threshold“ (Ct)-Wert wird die Anzahl der PCR-Zyklen bezeichnet, bei der die jeweilige Amplifikationskurve den Schwellenwert (Threshold) schneidet (s. 3.2.12.2. Auswertung der qPCR-Daten).	72

- Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse der IL-10 Primer. Die Dissoziationskurve zeigt, dass nur ein spezifisches Amplifikat gebildet wurde. Die Linien im Bereich des Null-Wertes stellen die Negativkontrollen dar.....73
- Abbildung 9: Verschiedene Phasen, die während einer qPCR durchlaufen werden. Als Ct-Wert bezeichnet man die Zykluszahl, zu der die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet.....76
- Abbildung 10: CADESI der atopischen Hunde, die 500 oder 2500 embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige CADESI-Wert angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.91
- Abbildung 11: CADESI der atopischen Hunde, die 100, 500 oder 2500 L3 von *U. stenocephala* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige CADESI-Wert angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.91
- Abbildung 12: Juckreiz (Pruritus) der atopischen Hunde, die 500 oder 2500 embryonierte Eier von *T. vulpis* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige Wert des Juckreizes angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.93
- Abbildung 13: Juckreiz (Pruritus) der atopischen Hunde, die 100, 500 oder 2500 L3 von *U. stenocephala* erhalten hatten, am Anfang und am Ende des Versuches. Auf der y-Achse ist der jeweilige Wert des Juckreizes angegeben, auf der x-Achse der zeitliche Verlauf.....93
- Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes der IL-10 Primer. Rechts und links außen ist der Marker aufgetragen. Links in der Mitte zeigt sich das PCR-Produkt (IL-10) als eine distinkte Bande im Gel (umkreist) mit einer Länge zwischen 100 und 150 Basenpaaren (bp). Rechts in der Mitte ist die Negativkontrolle (Ko -) aufgetragen worden, um Kontaminationen auszuschließen.95

- Abbildung 15: Ermittlung der Effizienz der IL-10 Primer anhand einer Standardkurve. Auf der y-Achse ist der Ct-Wert aufgetragen, auf der x-Achse die Verdünnungsstufe des log₁₀-verdünnten PCR-Produktes. Es wurde die Geradengleichung $y = 3,7086x + 2,7493$ mit einem Korrelationskoeffizienten $R^2 = 0,9954$ errechnet. Für die Effizienz des Primerpaares von IL-10 wurde $E = 1,86$ ermittelt.....96
- Abbildung 16: Aus den in Triplikaten pipettierten Proben wurde der Mittelwert der drei resultierenden Ct-Werte des Referenzgens (18S rRNA) und des jeweiligen Zielgens (IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β) desselben Gewebes bestimmt. Diese Mittelwerte wurden voneinander abgezogen, wodurch man den Delta (Δ)-Ct-Wert erhielt (Normalisierung).....97
- Abbildung 17: Amplifikationskurven der Positivkontrolle mit der caninen cDNA von stimulierten PBL. Es waren für alle Zytokine je drei Amplifikationskurven nachweisbar (Triplikate).....101
- Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese isolierter Gesamt-RNA. Die im Gel dargestellten Banden liegen im Bereich von 18S und 28S rRNA. ...103
- Abbildung 19: Amplifikationskurven für 18S rRNA in der qPCR der mit Natriumacetat gefällten Probe und der nur mit der TrifastTM-Methode gewonnenen Probe. Die Ct-Werte liegen dicht beieinander.....104

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der für die Studie verwendeten Primer.	58
Tabelle 2:	Willemse Kriterien.	59
Tabelle 3:	Aufstellung der in der qPCR verwendeten Primer und deren Eigenschaften.	69
Tabelle 4:	Rassen der untersuchten Hunde sowie deren jeweilige Anzahl.	89
Tabelle 5:	CADESI von Hunden mit atopischer Dermatitis am Anfang (vorher) und am Ende der Studie (nachher).	90
Tabelle 6:	Werte der Juckreizskala von Hunden mit atopischer Dermatitis am Anfang (vorher) und am Ende des Versuches (nachher).	92
Tabelle 7:	Allgemeine Beurteilungen der Haut der an dem Versuch teilnehmenden Hunde am Anfang (vorher) und am Ende der Studie (nachher).	94
Tabelle 8:	n-fache TGF- β Expression der zwölf atopischen Patienten am Ende im Vergleich zum Anfang der Studie und deren Zugehörigkeit zu einer der Behandlungsgruppen. Ein Wert von 1 für die Expression entspricht einer unveränderten Expression im Vergleich zum Studienbeginn.	99
Tabelle 9:	n-fache IL-10 Expression der zwölf atopischen Patienten am Ende im Vergleich zum Anfang der Studie und deren Zugehörigkeit zu einer der Behandlungsgruppen. Ein Wert von 1 für die Expression entspricht einer unveränderten Expression im Vergleich zum Studienbeginn.	100
Tabelle 10:	Ct-Mittelwerte der Triplikate der Positivkontrolle für die Primer von IL-4, IL-10, TGF- β , IFN- γ und 18S rRNA. Eine Kontamination konnte anhand der Negativkontrollen, die keine Ct-Werte erbrachten, ausgeschlossen werden.	102
Tabelle 11:	Ct-Mittelwerte der unterschiedlich gefällten RNA-Proben.	104
Tabelle 12:	Auswertung der Mastzellen in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.	105
Tabelle 13:	Auswertung der neutrophilen Granulozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.	106
Tabelle 14:	Auswertung der eosinophilen Granulozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.	106

Tabelle 15:	Auswertung der Lymphozyten in histologischen Präparaten am Anfang und am Ende der Studie.	107
Tabelle 16:	Befunde der Kotuntersuchungen der atopischen Hunde, die am Tag 0 (Beginn der Studie) embryonierte Eier von <i>T. vulpis</i> erhalten hatten.	108
Tabelle 17:	Ergebnisse der Kotuntersuchungen der atopischen Hunde, die am Tag 0 L3 von <i>U. stenocephala</i> erhalten hatten. Hund Nr. 3 wurde wegen Nebenwirkungen auf Wunsch des Besitzers an Tag 30 aus der Studie herausgenommen.	108

9.3. Besitzer Einverständniserklärung

Besitzer Einverständniserklärung

Ich stimme der Teilnahme meines Tieres an der Studie „**Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis**“ zu, in der die Beeinflussung des Immunsystems durch Würmer untersucht wird. Ich verstehe, dass mein Tier an einem klinischen Versuch teilnimmt. Entsprechend dem Studienprotokoll werden meinem Hund Wurmeier, entweder von *Trichuris vulpis* oder *Uncinaria stenocephala*, in einer bestimmten Konzentration verabreicht werden. Zusätzlich gebe ich mein Einverständnis, dass bei meinem Hund am ersten und letzten Besuch (nach 3 Monaten) jeweils 3 Hautbiopsien (4mm-Stanzen) unter lokaler Betäubung entnommen werden.

Ich wurde über potentielle Risiken (v.a. gastrointestinale Symptome) und Nutzen der Studie (Verbesserung der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Allergien) aufgeklärt. Weiterhin werde ich im Rahmen der mir zur Verfügung stehenden Möglichkeiten die Vorgaben der Studie erfüllen. Ich werde mein Tier monatlich zu Kontrolluntersuchungen vorstellen.

Die Kosten der sich wiederholenden Untersuchungen und Behandlungen (z.B. abschließende Entwurmung) innerhalb der Studie, werden von der Abteilung für Dermatologie der Medizinischen Kleintierklinik München übernommen.

Für über das Studienprotokoll hinaus gehende Untersuchungen und Behandlungen werden keine Kosten übernommen. Ebenso wenig werden Kosten für während der Studie weitergeführte Therapien (Antihistaminika, Fettsäuren, Shampoos, Desensibilisierung etc.) übernommen.

Unterschrift

Datum

Zeuge

Datum

9.4. Patientenprotokoll

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Individuelles Patienten – Protokoll

Fall Nr. ____

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Individuelles Patienten – Protokoll

Fall Nr.: **Tag 0 (Aufnahme in die Studie):**

Name des Besitzers:

Name des Hundes:

Patientennummer (MTK):

Rasse:

Alter:

Geschlecht:

Gewicht:

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Individuelles Patienten – Protokoll: Tag 0 (Besuch 1)

Fall Nr.: **Tag 0 (Aufnahme in die Studie):**

Name des Besitzers:

Name des Hundes:

Patientennummer (MTK):

Rasse:

Alter:

Geschlecht:

Gewicht:

Erfüllung der Einschlusskriterien:

- ☐ Vorliegen einer Atopie diagnostiziert nach den Kriterien nach Willemse und nach Ausschluss von klinisch infrage kommenden Differentialdiagnosen
- ☐ Hunde > 6 Monate
- ☐ sekundäre bakterielle und Malassezien-Infektionen: behandelt und beseitigt (vor Aufnahme in die Studie)
- ☐ keine parasitären Erkrankungen
- ☐ kein Vorliegen von immunsupprimierenden systemischen Krankheiten (z.B. Hyperadrenokortizismus, Hypothyreose, Diabetes mellitus)
- ☐ seit 6 Wochen keine Glukokortikoide (jegliche Präparate)
- ☐ derzeit keine Antibiotika
- ☐ negative Kotuntersuchung (Sammelprobe) direkt vor Aufnahme in die Studie
- ☐ unterschriebene Einverständniserklärung des Besitzers

Zusätzliche Therapien während der Studie:

Fettsäuren können weitergeführt werden, wenn sie schon **mehr als 3 Monate (12 Wochen)** vor Beginn der Studie begonnen wurden.

Antihistaminika können weitergeführt werden, wenn sie schon **mehr als 4 Wochen** (idealerweise > 3 Monate) vor Beginn der Studie begonnen wurden (selbe(s) Präparat(e)!).

Monatliche **Flohkontrolle mit Frontline®** (für Hunde mit Flohspeichelallergie), darf weitergeführt werden, wenn sie schon **mehr als 4 Wochen** (idealerweise > 3 Monate) vor Beginn der Studie begonnen wurde; wird eine Flohprophylaxe mit Stronghold® durchgeführt, dann muss mindestens 1 Monat vor Beginn der Studie auf Frontline gewechselt worden sein!

Diät darf weitergeführt werden, wenn sie schon **mehr als 3 Monate (12 Wochen)** vor Beginn der Studie begonnen wurde.

Shampootherapie kann weitergeführt werden, wenn sie schon **mehr als 2 Wochen** vor Beginn der Studie begonnen wurde (selbe(s) Präparat(e)!).

Allergen-spezifische Immuntherapie (Desensibilisierung) kann weitergeführt werden, wenn Sie schon **12 Monate vorher** begonnen wurde.

Während der Studie darf an zusätzlichen Therapien (Fettsäuren, AH, Flohkontrolle, Diät, Shampootherapie, Desensibilisierung, etc.) nichts verändert werden!

=> somit darf _____ folgende Therapien fortsetzen (KEINE Veränderungen innerhalb der Studie):

- | | | |
|--|-----------|-------------|
| <input type="checkbox"/> Fettsäuren: | Präparat: | Dosierung: |
| <input type="checkbox"/> Antihistaminikum: | Präparat: | Dosierung: |
| <input type="checkbox"/> Frontline® (monatlich) | | |
| <input type="checkbox"/> Diät mit: | | |
| <input type="checkbox"/> Shampootherapie: | Präparat: | Häufigkeit: |
| <input type="checkbox"/> Allergen-spezifische Immuntherapie (seit: | |) |

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Global Assessment

- ☐ exzellent
- ☐ gut
- ☐ ausreichend
- ☐ ungenügend

Juckreizskala

Kein Juckreiz ●—————● Ernster Juckreiz

Hautbiopsien (4mm, 3x)

1x Histologie

2x qPCR (sofortiges Verbringen in flüssigen Stickstoff)

Entnahmestelle(n):

Examiner:

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal	Left					
			Right				
	Ventral	Left					
			Right				
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)			TOTAL Score (1240 maximum)				

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Individuelles Patienten – Protokoll: Tag 30 (Besuch 2)

Fall Nr.:

Tag 30 (2. Besuch nach 1 Monat):

Name des Besitzers:

Name des Hundes:

Patientennummer (MTK):

Gewicht:

**Auftreten von unerwünschten Wirkungen durch die Verabreichung der
Wurmeier:**

☐ ja ☐ nein Details:

Ausschluss aus der Studie: ☐ ja ☐ nein

☐ **Kotprobe (Sammelprobe) zum 2. Besuch mitgebracht und Kotunter-
suchung eingeleitet**

Juckreizskala

Kein
Juckreiz



Ernster
Juckreiz

Examiner:

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Left					
		Right					
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)					TOTAL Score (1240 maximum)		

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Individuelles Patienten – Protokoll: Tag 60 (Besuch 3)

Fall Nr.: Tag 60 (3. Besuch nach 2 Monaten):

Name des Besitzers:

Name des Hundes: Patientennummer (MTK):

Gewicht:

**Auftreten von unerwünschten Wirkungen durch die Verabreichung der
Wurmeier:**

☐ ja ☐ nein Details:

Ausschluss aus der Studie: ☐ ja ☐ nein

☐ **Kotprobe (Sammelprobe) zum 3. Besuch mitgebracht und Kotunter-
suchung eingeleitet**

Juckreizskala

Kein Juckreiz ● ————— ● Ernster Juckreiz

Examiner:

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Left					
		Right					
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)							TOTAL Score (1240 maximum)

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

**Individuelles Patienten – Protokoll: Tag 90
(Besuch 4, letzter Besuch)**

Fall Nr.: Tag 90 (4. Besuch nach 3 Monaten):

Name des Besitzers:

Name des Hundes: Patientennummer (MTK):

Gewicht:

**Auftreten von unerwünschten Wirkungen durch die Verabreichung der
Wurmeier:**

☐ ja ☐ nein Details:

Ausschluss aus der Studie: ☐ ja ☐ nein

☐ Kotprobe (Sammelprobe) zum 4. Besuch mitgebracht und Kotunter-
suchung eingeleitet

☐ entwurmt

Die Immunmodulation der caninen atopischen Dermatitis durch Helminthen

- vertraulich -

Global Assessment

- ☐ exzellent
- ☐ gut
- ☐ ausreichend
- ☐ ungenügend

Juckreizskala

Kein Juckreiz ●—————● Ernster Juckreiz

Hautbiopsien (4mm, 3x)

1x Histologie

2x qPCR (sofortiges Verbringen in flüssigen Stickstoff)

Entnahmestelle(n):

Examiner:

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Left					
		Right					
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)			TOTAL Score (1240 maximum)				

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Ralf Müller für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Betreuung diese Dissertation anfertigen zu dürfen. Seine jederzeit schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen Problemsituationen während der Anfertigung dieser Arbeit sowie seine uneingeschränkte Unterstützung und Motivation und die immer gute und freundliche Zusammenarbeit waren von großer Bedeutung für mich.

Herrn Professor Thomas Göbel danke ich vielmals für die wunderbare Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre, die ich während meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe genießen durfte. Seinen Rat bei jeglichen Fragestellungen habe ich immer sehr geschätzt.

Frau Professor Katrin Hartmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellen zu dürfen.

Herrn Dr. Christian Epe möchte ich großen Dank für die externe Betreuung dieser Arbeit in allen parasitologischen Fachfragen aussprechen. Seine allzeit gewährte kompetente Hilfe und Unterstützung sowie die stets freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit waren eine Bereicherung.

Ein ganz besonders herzlicher und lieber Dank gilt Herrn Dr. Matthias Hanczaruk, der mich mit unendlich viel Geduld in die hochsensiblen Labortechniken einwies und mir immer in allen Angelegenheiten fachlich und freundschaftlich zur Seite stand. Seine immer fröhliche und motivierende Art half so manche Laborkrise zu überstehen.

Auch Frau Dr. Melanie Stehle möchte ich für die Einarbeitung in die Methoden im Labor sowie für die freundschaftliche Motivation und den Zuspruch bei meiner Arbeit großen Dank aussprechen.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Dr. Susanne Schwarz, die mich vor allem gegen Ende der Arbeit jederzeit bei allen labortechnischen Fragen schnell und sehr kompetent unterstützt hat.

Vielmals möchte ich mich auch bei meinen Kollegen aus der Klinik und aus dem Labor bedanken. Mein Dank richtet sich vor allem an Frau Martina Ley, Frau Amelie Krause, Frau Annemarie Stroh, Herrn Georg Lehner, Frau Dr. Ursula Mayer, Frau Dr. Britta Schnabl, Frau Amelie von Voigts-Rhetz, Frau Ramona Schmitt und Frau Claudia Gick für die schöne Zusammenarbeit und allzeit gewährte Hilfeleistung.

Den Mitarbeitern aus dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich herzlich für die exzellente und schnelle Herstellung der histologischen Präparate. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Daniela Denk für ihren immer gerne gewährten fachlichen Rat und ihre Hilfe.

Ich bedanke mich vielmals bei Frau Petra Thomas und Frau Dr. Sonja Wolken vom Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Bereitstellung der Helminthenstadien und für die freundliche und gute Zusammenarbeit. Ohne ihre Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Beim Laborpersonal der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich mich für die Untersuchung der Kotproben bedanken.

Ein ganz lieber Dank geht an Chester, Ginger, Gipsy, Lilly, Lucky, Moritz, Nicko, Robby, Ronja, Ronny, Struppi und Vitus sowie deren Besitzer, ohne die es diese Dissertation nie gegeben hätte. Sie haben diese wissenschaftliche Studie bedingungslos unterstützt und bereichert sowie dazu beigetragen, in der Zukunft neue Therapiemöglichkeiten für die canine atopische Dermatitis zu eröffnen. Sie werden mir alle in liebevoller Erinnerung bleiben.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern für ihre aufopferungsvolle und bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Lebensweges und vor allem für ihre Hilfe, Motivation und ihr großes Verständnis in schwierigen Zeiten während des Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation. Mit viel Liebe haben sie mir jederzeit ermöglicht, meinen Lebensweg zu finden, diesen zu verfolgen und dabei selber auf Vieles verzichtet. Sie haben mir die Flügel gegeben, die ich brauchte um zu fliegen. Ich liebe euch. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinem Partner und besten Freund Markus bedanken, der mir jederzeit durch alle Krisen während des Studiums und dieser Arbeit geholfen hat. Für seine liebevolle Unterstützung, seine unendliche Geduld, sein grenzenloses Verständnis in stressigen Zeiten, seine motivierende und aufbauende Art, sein großes Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten und vor allem für seine Liebe und die Kraft, die ich daraus schöpfe, werde ich immer unendlich dankbar sein.